



Dipartimento di Scienze Veterinarie
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**“Analisi sierologica e di biologia molecolare
nello screening delle malattie infettive
trasmissibili per via ematica nei cani
donatori di sangue”**

CANDIDATA

Veronica Gori

RELATORE

Prof. George Lubas

CORRELATRICE

Dott.ssa Alessandra Gavazza

Anno Accademico 2015 -2016

“Le nostre menti sono finite, e nonostante queste condizioni di finitezza siamo circondati da possibilità che sono infinite, e lo scopo della vita è cogliere il più possibile da questa infinità”

Alfred North Whitehead

“La leggenda dice che Dio creò le diverse razze di cani dall’argilla. Dovendo creare l’ultima, decise di creare il cane più bello e di chiamarlo Boxer. Ma questo cane era così vanitoso che corse a specchiarsi prima che l’argilla fosse completamente asciutta e schiacciò il naso contro lo specchio. Questo spiega il musetto piatto dei Boxer”

(Anonimo)

A Nereo...



INDICE

RIASSUNTO	Pag. 6
INTRODUZIONE	Pag. 7
PARTE GENERALE	
Capitolo 1 - MEDICINA TRASFUSIONALE	
1.1 Storia della medicina trasfusionale	Pag. 10
1.2 Gruppi Sanguigni e Compatibilità Donatore – Ricevente	Pag. 16
<i>1.21 Gruppi sanguigni</i>	Pag. 17
<i>1.22 Determinazione dei gruppi sanguigni</i>	Pag. 25
<i>1.23 Cross-matching test o Prova di compatibilità crociata</i>	Pag. 32
1.3 Donazione di sangue	Pag. 36
1.4 Prodotti trasfusionali e indicazioni d'uso	Pag. 47
<i>1.41 Emocomponenti</i>	Pag. 49
Sangue fresco intero	49
Sangue intero conservato	50
Concentrato eritrocitario	51
Plasma fresco congelato	53
Plasma congelato	55
Crioprecipitato	56
Plasma privo di crioprecipitato	56
Plasma ricco di piastrine	57
Concentrato piastrinico	57
1.5 Somministrazione della trasfusione e monitoraggio del paziente	Pag. 58
1.6 Reazioni trasfusionali	Pag. 67
<i>1.61 Reazioni trasfusionali acute immuno-mediate</i>	Pag. 69
Emolisi immunomediata	69
Reazione febbrile non emolitica	69
Reazione allergiche - anafilattiche da ipersensibilità	70
Danno polmonare acuto da trasfusione	71
<i>1.62 Reazioni trasfusionali acute non immuno-mediate</i>	Pag. 71
Sepsi associata a trasfusione	71
Ipervolemia e sovraccarico circolatorio associato a trasfusione	71
Emolisi non immuno-mediata	72

Intossicazione da citrato	72
Embolia gassosa	73
Ipotermia	73
1.63 Reazioni trasfusionali ritardate	Pag. 73
Emolisi immuno-mediata ritardata	73
Precoce distruzione dei globuli rossi	74
Trasmissione malattie	74

Capitolo 2- REGOLAMENTAZIONE GIURIDICA DELLA MEDICINA

TRASUSIONALE

2.1 Legislazione italiana della medicina trasfusionale veterinaria	Pag. 75
<i>2.11 Articolo 1</i>	Pag. 76
<i>2.12 Articolo 2</i>	Pag. 77
<i>2.13 Articolo 3</i>	Pag. 77
<i>2.14 Articolo 4</i>	Pag. 77
<i>2.15 Articolo 5</i>	Pag. 78
<i>2.16 Articolo 6</i>	Pag. 82
<i>2.17 Articolo 7</i>	Pag. 82
<i>2.18 Articolo 8</i>	Pag. 87
<i>2.19 Articolo 9</i>	Pag. 87
<i>2.20 Articolo 10</i>	Pag. 87
2.2 Analisi critica della linea guida e confronto tra le due versioni	Pag. 88

Capitolo 3- MALATTIE EMOTRASMISSIBILI E SCREENING DEI DONATORI

3.1 – Malattie trasmissibili con la trasfusione: CVBDs o Canine	Pag. 94
Vector Borne Disease	
<i>3.11 Elementi epidemiologici legati alle CVBDs</i>	Pag. 95
<i>3.12 Principali vettori competenti delle CVBDs</i>	Pag. 100
Rhipicephalus sanguineus	100
Ixodes ricinus	103
Dermacentor reticulatus	105
Flebotomi	108
<i>3.13 Principali CVBDs oggetto di screening nei cani donatori</i>	Pag. 112
Anaplasmosi	112
Ehrlichiosi granulocitica canina	124
Leishmaniosi canina	130
Babesiosi	141
Hepatozoonosi	155

Rickettsiosi	161
Dirofilariosi	161
Borreliosi	161
Bartonellosi	162
3.2 Screening delle CVBDs nei cani donatori	Pag. 162
 PARTE SPERIMENTALE	
1. Premessa	Pag. 168
2. Materiali e Metodi	Pag. 169
2.1 <i>Selezione dei campioni</i>	Pag. 170
2.2 <i>Sierologia -IFAT</i>	Pag. 171
2.3 <i>PCR end- point</i>	Pag. 172
2.4 - <i>Rtq PCR</i>	Pag. 173
3. Risultati	Pag. 174
4. Discussione	Pag. 176
5. Conclusione	Pag. 177
 BIBLIOGRAFIA	Pag. 177
SITOGRAFIA	Pag. 214
RINGRAZIAMENTI	Pag. 215

RIASSUNTO

La Linea Guida sulle trasfusioni impone lo screening sierologico e molecolare dei cani donatori per garantire l'esenzione del sangue trasfuso da patologie "blood-borne" trasmissibili. La parte sperimentale della tesi consiste nello screening di un gruppo di cani donatori del CTV- Università di Pisa, in assenza di alterazioni cliniche ed emato-biochimiche, tramite confronto sierologia (IFAT)-analisi molecolare (PCR end point e rtq-PCR) per i patogeni: *Babesia spp.*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *L. infantum* e *H. canis*. Lo scopo è verificare, mediante le tecniche molecolari, la presenza del DNA patogeni nei campioni ad alto titolo anticorpale, confermare i negativi e saggiare le titolazioni dubbie per includere - escludere potenziali donatori. Sono stati scelti 42 campioni di sangue intero congelato, prelevati nel periodo gennaio 2014 -febbraio /marzo 2016 da 29 donatori volontari di sesso, razza ed età diverse. I campioni sono stati scelti in base al risultato al test IFAT per *L. infantum*, *E. canis* e *A. phagocytophilum*, classificati in positivi, negativi e dubbi, e sottoposti ad analisi PCR end-point presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Veterinarie. L'analisi è stata estesa anche a *Babesia spp.* e *H. canis*, per i quali non è previsto alcun screening sierologico. I campioni positivi alla PCR end -point, 11 su 42, sono stati inviati alla "Laboratorio Veterinario Privato San Marco "a Padova, per fare analisi rtq-PCR e quantificare la positività riscontrata. Alcuni campioni sono stati inviati anche alla sede di Padova dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per un ulteriore controllo della ricerca di *L. infantum*, *A. phagocytophilum* ed *E. canis*. I risultati esterni hanno confermato solamente 1 unica p positività (quantitativamente debole) per *H. canis*. Si ritiene quindi che basse titolazioni anticorpali positive, senza alterazioni cliniche e clinico-patologiche e non confermate dalla PCR, non escludono l'impiego di un soggetto come donatore. Si suggerisce l'introduzione del prelievo di un tampone congiuntivale per incrementare la sensibilità della ricerca di frammenti di DNA appartenenti a *L. infantum*.

Parole chiave: cane, donatore di sangue, screening per malattie infettive, sierologia, biologia molecolare

ABSTRACT

The guideline on transfusions requires serological and molecular screening of donor dogs to ensure the exemption of blood transfused from "blood-borne" transmissible diseases . The experimental part of the thesis consists in the screening of a group of donor dogs from CTV- University of Pisa, without clinical and blood-biochemical alterations, by comparison of serology (IFAT) and molecular analysis (PCR endpoint and RTQ-PCR) for pathogens: *Babesia spp.*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *L. infantum* and *H. canis*. The purpose is to verify, through molecular techniques, the presence of pathogen's DNA in high antibody titer samples, confirm negative samples and test the borderline titration to include - exclude potential donors. They were chosen 42 whole blood samples frozen, taken in the period January 2014-February / March 2016 from 29 volunteer donors of various sex, race and ages. Samples were selected based on the result at the IFAT test for *L. infantum*, *E. canis* and *A. phagocytophilum*, classified into positive, negative and doubts, and subjected to PCR analysis endpoint at the laboratories of the Veterinary Sciences Department. The analysis was extended to *Babesia spp.* and *H. canis*, for which there is no provision for serological screening. Positive samples to PCR end -point, 11 to 42, were sent to the "Veterinary Laboratory Private San Marco" in Padua, to RTQ-PCR analysis and quantify the observed positive. Some samples were also sent to the Paduan's headquarter of "Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie" for further control of the detection of *L. infantum*, *A. phagocytophilum* and *E. canis*. External results have confirmed only one positivity (quantitatively weak) for *H. canis*. It is therefore considered that low positive antibody titrations, without clinical and clinical-pathological disorders and not confirmed by PCR, do not rule out the use of a subject as a donor. It suggests the introduction of the levy of a conjunctival swab to increase the sensitivity of the search for fragments of DNA belonging to *L. infantum*

Key words: dog; blood donor; screening for infectious diseases; serology; molecular biology

INTRODUZIONE

La pratica della medicina trasfusionale negli animali ha origini lontane nel tempo: risalgono infatti al XVII sec. i primi tentativi di trasferimento di sangue da un soggetto all'altro. Solamente nel XX sec., tuttavia, la medicina trasfusionale veterinaria ha fatto notevoli passi avanti e assunto un ruolo di maggiore rilevanza, grazie agli studi sui gruppi sanguigni e sui principali prodotti trasfusionali. Attualmente in tutto il mondo sono presenti banche del sangue ad uso veterinario finalizzate ai seguenti scopi: selezione e controllo dei soggetti donatori, prelievo del materiale ematico, preparazione, conservazione e commercio dei prodotti trasfusionali. L'inserimento delle trasfusioni nella pratica clinica quotidiana ha sollevato la necessità di una regolamentazione giuridica del settore; a livello europeo solamente il Ministero della Salute italiano ha emanato, nel 2008, una linea guida *“Linea Guida relativa all'esercizio delle Attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario”*, aggiornata nel Febbraio 2016, al fine di armonizzare le varie pratiche in un unico protocollo standardizzato per la tutela di ricevente e donatore. Tale linea guida presenta un difetto sostanziale all'interno del campo di applicazione, oggetto di dibattito nell'ambiente scientifico: autorizza l'utilizzo del sangue intero e disciplina i vari aspetti connessi ma esclude gli emocomponenti, erroneamente equiparati agli emoderivati nella normativa sul farmaco veterinario (D.Lgs .n. 193/2006). La medicina trasfusionale, come evidenziato nella linea guida, non è una pratica esente da rischi, in particolare il rischio di trasmissione al ricevente di malattie infettive legate al sangue, CVBDs o Canine Vector Borne Diseases. Le CVBDs sono malattie infettive trasmesse da vettori, ad elevata diffusione sul territorio italiano e, essendo in alcuni casi, di natura zoonotica, costituiscono pertanto un rilevante problema di sanità pubblica umana e veterinaria. Per questo motivo un aspetto fondamentale della medicina trasfusionale è rappresentato dallo screening periodico dei donatori per tali malattie emo-trasmissibili. L'obiettivo di suddetta tesi è approfondire le modalità di screening dei soggetti donatori normalmente impiegate all'interno delle banche del sangue, per verificarne la validità mediante confronto tra le tecniche impiegate. La prima parte a

carattere generale espone i principi della medicina trasfusionale, gli aspetti medico-legali connessi con riferimento alla Linea Guida Ministeriale, e le principali patologie trasmissibili oggetto dell'analisi sperimentale (*Babesia spp.*, *Leishmania infantum*, *Hepatozoon spp.*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum*) con focalizzazione su ciascun quadro eziopatogenetico e sull'importanza sanitaria. La seconda parte a carattere sperimentale effettua lo screening per i principali emopatogeni trasmissibili, di un gruppo di donatori canini del Centro Trasfusionale dell'Università di Pisa, clinicamente sani e in assenza di alterazioni emato-biochimiche, mediante il confronto tra sierologia (IFAT) e analisi biomolecolare, PCR end point e rtq-PCR. Tale screening è finalizzato a verificare la presenza dell'agente patogeno nei campioni ad elevata titolazione anticorpale, confermare i soggetti negativi e saggiare le titolazioni dubbie o "borderline" al fine di includere / escludere dalla donazione potenziali donatori.

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1

MEDICINA TRASFUSIONALE

1.1 STORIA DELLA MEDICINA TRASFUSIONALE

La nascita e l'evoluzione della medicina trasfusionale veterinaria sono relativamente recenti rispetto alla ben più antica pratica in medicina umana, ma sono ad essa strettamente interconnessi in quanto gli animali rappresentavano la principale fonte ematica a cui attingere (Cotter,1991; Learoyd,2006).

L'utilizzo del sangue all'interno di pratiche rituali - mediche per i suoi riconosciuti benefici terapeutici è riportato sin dall'antichità; tuttavia la trasfusione vera e propria è diventata un intervento terapeutico di comune impiego solamente nel secolo scorso, come conseguenza di studi ed esperimenti iniziati sin dalla metà del XVII sec. sulla natura del sangue, l'anatomia e la fisiologia circolatoria (Giangrande,2000; Learoyd,2006).

Fino al rinascimento la medicina tradizionale si fondava sulle teorie degli antichi greci e romani, in particolare sulla “Teoria Umorale” avanzata da Ippocrate e successivamente avvalorata anche da Galeno: tutta la materia vivente è composta da quattro sostanze – sangue, flegma, bile gialla e bile nera – normalmente in equilibrio tra loro. Secondo questa teoria le malattie derivavano dalla rottura dell'equilibrio tra gli umori circolanti e dal prevaricare di uno sugli altri, con conseguenti sintomi e alterazioni della personalità indicate da termini ancora oggi impiegati: “sanguigno”(eccesso di sangue) , “flemmatico” (eccesso di flegma),“ melanconico” (eccesso di bile nera) e “collerico” (eccesso di bile gialla). Una conseguenza importante di tale teoria fu l'impostazione della pratica medica su un approccio di stampo olistico: la cura principale delle patologie consisteva nel ripristino dell'equilibrio tra gli umori mediante cura dell'alimentazione e dell'ambiente domestico, e pratiche come dieta, purificazione e salasso (Giangrande, 2000).

Il limite principale della medicina tradizionale era rappresentato dalle scarse conoscenze anatomiche sul sistema cardio- circolatorio: si riteneva infatti che il sangue semplicemente

fluisse e rifluisse all'interno delle vene periferiche, e una parte di esso attraversasse dei pori del setto interventricolare per mescolarsi al “pneuma” o “spirito vitale” inspirato insieme all'aria e fonte di nutrimento per il cervello (Giangrande , 2000).



Figura 1.1 - L'influenza dei quattro umori sulla personalità - The influence of the four humors on personality (Giangrande, 2000)

Un traguardo importante venne raggiunto nel 1616, anno in cui William Harvey descrisse l'anatomia della circolazione sanguigna e la funzionalità cardiaca, ripreso successivamente da altri studiosi come Hales: la conoscenza di un sistema cardio-circolatorio chiuso rappresenta un pre-requisito essenziale per il concetto di trasfusione ematica da un soggetto ad un altro (Cotter,1991; Hosgood, 1990).

Gli esperimenti sulla trasfusione di sangue procedettero gradualmente, all'inizio mediante trasfusione da un animale all'altro e successivamente dagli animali all'uomo (Giangrande, 2000).

La prima trasfusione tra animali realmente documentata risale al 1666 ed è attribuibile al medico inglese Richard Lower, che fece defluire del sangue dall'arteria carotide di un cane alla vena giugulare di un altro mediante un tubo connettore in argento. Negli stessi anni il fisico francese Jean Denis realizzava studi su trasfusioni intra - interspecifiche uomo – animali per curare sintomi di patologie mentali; in linea con la teoria umorale riteneva infatti che l'immissione di sangue da un animale docile avrebbe mitigato una mente turbata

e squilibrata (Giangrande,2000; Learoyd,2006). Nel corso degli esperimenti Denis rilevò le prime manifestazioni cliniche di reazioni post-trasfusionali (febbre alta, sudorazione, mal di schiena, vomito e urine scure) dettagliatamente descritte in seguito, nel 1874, dal ricercatore tedesco Leonard Landois: lisi dei globuli rossi, petecchie, emoglobinuria e danno renale. La morte di un paziente durante uno degli esperimenti, in tempi successivi non attribuita al trattamento, comportò il veto di praticare ulteriori trasfusioni e, di fatto, interruppe gli studi per oltre un secolo (Hosgood,1990; Cotter, 1991 ; Learoyd,2006).

Nel XIX sec. l'interesse per la pratica trasfusionale si riaccese grazie all'ostetrico inglese James Blundell, e al suo intento di risolvere la problematica delle morti per emorragia post-partum. Gli studi di Blundell per la prima volta dimostrarono l'eguale efficacia di sangue arterioso e venoso in corso di trasfusione, ma soprattutto, la minor efficacia delle trasfusioni interspecifiche animale – uomo promuovendo l'impiego di sangue umano (ipotesi inizialmente accantonata e avvalorata solamente in seguito) (Cotter, 1991; Learoyd,2006). Blundell pubblicò il suo primo caso di trasfusione inter-umana su una rivista della Società Medico – Chirurgica di Londra nel 1818, e questo segnò l'inizio dell'era della moderna medicina trasfusionale. (Giangrande, 2000).

Un importante passo avanti nell'evoluzione della medicina trasfusionale venne realizzato con la scoperta dei gruppi sanguigni e delle incompatibilità di specie, inizialmente tra specie diverse e successivamente anche all'interno della specie umana tra individuo e individuo. Alla fine dell'800 Landois dimostrò che la mescolanza di globuli rossi di una specie animale con siero di un'altra determinava lisi eritrocitaria entro 2 minuti. Pochi decenni dopo invece l'anatomo-patologo Karl Landsteiner dimostrava un'incompatibilità all'interno della specie umana ricollegabile ad un fenomeno immunologico determinato dalla presenza di diversi antigeni eritrocitari; da lì determinò l'esistenza dei gruppi sanguigni A,B, AB e 0. La scoperta degli antigeni eritrocitari e la classificazione nei gruppi sanguigni umani, stimolarono notevolmente la ricerca anche in campo veterinario. Negli anni successivi si arrivò infatti alla determinazione dei gruppi sanguigni anche nella specie canina: inizialmente A,B, AB, O (1910 Von Dungern e Hirzfeld), successivamente, nel 1950, A,B,C,D,E,F,G (Swisher e Young) e solo nel 1974 la attuale nomenclatura DEA. Iniziarono così i primi test di compatibilità pre-trasfusione: un test in vitro con miscelazione del sangue donatore -ricevente e osservazione per 24-48 h, o un test clinico con somministrazione al ricevente di circa 10-20 ml di sangue del donatore, per testare l'insorgenza di reazioni avverse (Cotter,1991; Hosgood, 1990; Wardrop, 2007).

Nel 1912 Todd e White, grazie ai loro esperimenti sulla sopravvivenza dei globuli rossi omologhi trasfusi nei bovini, dimostrarono la presenza di incompatibilità tra donatore e ricevente anche all'interno della stessa specie per fattori individuali. Si verificava infatti, a seguito di questo fenomeno, la scomparsa precoce delle emazie trasfuse dal circolo nel ricevente, e lo sviluppo di proprietà emolitiche del siero del ricevente nei confronti del sangue del donatore (Cotter, 1991; Hosgood, 1990).

Negli stessi anni gli studiosi concentrarono i propri studi sulla ricerca di un metodo per impedire la rapida e inevitabile coagulazione del sangue prelevato, costituente un limite alla quantità del sangue trasfondibile. Agli esordi della pratica trasfusionale il sangue prelevato veniva semplicemente somministrato al ricevente prima che coagulasse, in seguito si passò ad usare il sangue defibrinato, sangue prelevato da un vaso aperto e mescolato per stimolare la formazione del coagulo, poi rimosso, lasciando intatta la parte fluida da trasfondere. Studi dimostrarono che il sangue defibrinato era efficace nel rianimare animali salassati e nella medicina d'urgenza, tuttavia frequentemente provocava gravi reazioni febbrili. Il chirurgo vascolare Alexis Carrel mise a punto una tecnica chirurgica consistente in una anastomosi temporanea tra un'arteria del donatore e la vena del ricevente. Questa tecnica permetteva la trasfusione di grandi quantità di sangue ma presentava diverse problematiche, tra cui la disponibilità del donatore alla chirurgia e la difficoltà nel valutare con precisione la quantità di sangue trasfusa, difatti frequentemente sfociava in ipotensione del donatore e sovraccarico circolatorio nel ricevente. Fu chiaro che l'unico modo per superare questo problema era trovare sostanze ad azione anticoagulante, stabili e non tossiche, da aggiungere al sangue raccolto per permetterne una conservazione a lungo termine. L'inserimento di sostanze anticoagulanti fu oggetto di numerosi studi sin dalla fine del '700, tuttavia si concretizzò solamente nel 1868 quando l'ostetrico inglese Braxton Hicks sperimentò le proprietà di una soluzione di fosfato di sodio, rilevandone tuttavia elevata tossicità. L'introduzione nella medicina trasfusionale del citrato di sodio come anticoagulante in soluzione al 0,2% (per evitarne la tossicità) è attribuibile a Richard Lewinsohn. Esperimenti successivi nel corso del tempo portarono alla scoperta di altre sostanze come ACD o citrato acido-destrosio e il CPD o citrato fosfato – destrosio (Cotter, 1991; Giangrande, 2000; Leary, 2006).

Nonostante i fiorenti sviluppi in ambito accademico, nella pratica clinica veterinaria la medicina trasfusionale ha iniziato a trovare spazio a partire dagli anni '50 per la disponibilità di adeguate tecniche e attrezzature, e solo negli ultimi decenni ha raggiunto un importante

livello di approfondimento, con impiego del sangue e dei principali prodotti trasfusionali in tutto il mondo (Cotter,1991; Hosgood, 1990; Davidow, 2013).

Al giorno d'oggi le trasfusioni in medicina veterinaria sono diventate sempre più comuni e praticate con maggior facilità, perché parte integrante del trattamento "salva-vita" di numerose patologie critiche : ad esempio anemie potenzialmente fatali provocate da emorragie acute o prolungato sanguinamento in sede chirurgica, grave ipossia tissutale, ridotta produzione eritrocitaria, emolisi da tossici o farmaci, patologie immunomediate, gravi condizioni non rigenerative e anche l'isoeritrolisi neonatale (Tocci,2009 ; Tocci, 2010).

Il rapporto causa - effetto di tale espansione della medicina trasfusionale si è manifestato in un notevole sviluppo dell'indotto ad esso collegato: banche del sangue animale, centri di selezione e controllo periodico dei soggetti donatori, strutture di preparazione dei prodotti trasfusionali e loro commercializzazione, centri di ricerca su sostituti dei componenti ematici. Sicuramente la presenza di tecniche avanzate nello screening dei donatori, tipizzazione dei gruppi sanguigni e prove di compatibilità, così come la possibilità di scelta tra diversi prodotti trasfusionali ha potenzialmente reso la medicina trasfusionale più complessa, ma permette al Medico Veterinario di scegliere la terapia più adeguata per il suo paziente e le sue necessità, minimizzando il rischio di reazioni avverse (Davidow, 2013).

L'inconveniente principale risultante consiste in una continua domanda di sangue, e quindi nella necessità di trovare una strategia per reclutare nuovi donatori e contemporaneamente mantenere attivi quelli già impiegati. Uno studio realizzato dal Centro Trasfusionale del Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa, la sezione AVIS Livorno e la USL Livorno, ha dimostrato, mediante un sondaggio statistico dell'AVIS sui propri donatori, che gli atti donatori sono principalmente di natura altruistica sia in medicina umana che veterinaria, e che, nella maggior parte dei casi, i proprietari di animali donatori sono essi stessi donatori. D'altro canto è stata evidenziata anche una notevole mancanza di informazioni riguardanti l'esistenza della pratica trasfusionale anche negli animali (78,1%) e l'esistenza dei Centri trasfusionali veterinari (86,1%) (Ceretelli, 2012).

Da questi presupposti nasce, nel 2012, l'idea di una collaborazione tra medicina veterinaria e umana, finalizzata ad una maggiore sensibilizzazione nei confronti delle donazioni di sangue, anche da parte degli stessi proprietari dei cani donatori. Infatti la procedura di prelievo nel cane può rappresentare un momento educativo anche per l'uomo e, contemporaneamente, diffondere la conoscenza dell'esistenza del centro trasfusionale per

promuovere le donazioni veterinarie. Il frutto di questo studio è la stipula di una convenzione tra l'AVIS della Regione Toscana e il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa, secondo la quale entrambe le parti si impegnano a collaborare per favorire la conoscenza e la diffusione della cultura della donazione di sangue come gesto di solidarietà nell'uomo e nel cane. L'AVIS inoltre mette a disposizione i propri canali di comunicazione per la pubblicizzazione di articoli riguardanti la donazione veterinaria, e la divulgazione a tutte le sedi regionali.



Figura 1.12 - Progetto congiunto AVIS e Università di Pisa (www.controcampus.it)

Un altro progetto importante in tale direzione, patrocinato dall' A.N.M.V.I e dall'F.N.O.V.I., è il DbD o “*Dog Blood Donors*”, una banca dati gratuita dei cani donatori su scala nazionale, fruibile da tutti i Medici Veterinari iscritti, e finalizzata ad una rapida ricerca di un donatore disponibile ogni qualvolta sia necessario praticare una trasfusione. I cani vengono iscritti volontariamente dai proprietari e tutti possono accedervi previa verifica, da parte di un Medico Veterinario, del gruppo sanguigno per stabilire se l'animale è idoneo come donatore o solo come ricevente. Come prima cosa è necessaria la registrazione del Medico Veterinario e/ o della sua struttura per poter accedere e consultare la Banca Dati e attivare le iscrizioni dei cani donatori. La registrazione permetterà di rendere visibile la struttura ai proprietari interessati all'iscrizione dei propri cani. L'iscrizione del cane alla Banca Dati può essere fatta dal proprietario ma deve essere completata dal Medico Veterinario a seguito della visita clinica e dell'individuazione del gruppo sanguigno. L'idoneità all'iscrizione nella Banca Dati, in qualità di donatore, richiede il rispetto dei requisiti di base fissati dalla Linea Guida per la medicina trasfusionale: età 2-9 anni, peso > 20 Kg, identificazione con microchip e iscrizione all'anagrafe canina,

vaccinazioni di base, carattere docile, non sottoposto a terapie farmacologiche durature, gruppo sanguigno DEA negativo – DEA positivo. In caso di necessità un Medico Veterinario iscritto alla DbD può accedere alla Banca dati e ricercare un potenziale donatore filtrando i dati (caratteristiche del cane – gruppo sanguigno – dati del proprietario), e contattare direttamente il proprietario del donatore per richiedere la sua disponibilità. Il proprietario non è vincolato alla donazione nel caso in cui non fosse disponibile, tuttavia il regolamento prevede che ogni iscritto garantisca la propria disponibilità per un massimo di 2 volte l'anno. Al momento della donazione, i donatori vengono sottoposti agli esami del sangue come previsto dalla Linea Guida sulla medicina trasfusionale. La DbD offre un servizio fondamentale per i cani e i loro proprietari, in quanto permette di individuare il loro gruppo sanguigno e di avere accesso ad una trasfusione in tempi rapidi e in totale sicurezza (in quanto sia ricevente che donatore sono testati e controllati), e per gli stessi Medici Veterinari che, registrandosi, rendono visibile la propria struttura e possono accedere all'elenco dei donatori in caso di necessità (www.dogblooddonors.it).



Figura 1.12- Progetto "Cani Donatori di Sangue" - Dog blood donor (www.dogblooddonor.it)

1.2 GRUPPI SANGUIGNI E COMPATIBILITA'

DONATORE – RICEVENTE

La medicina trasfusionale, al giorno d'oggi, è diventata oramai una pratica terapeutica comune nella clinica dei piccoli animali, principalmente grazie a: rapido accesso ai prodotti trasfusionali, sia ricorrendo a donatori propri che acquistandoli presso le banche del sangue, programmi di donazione esterni e disponibilità di sostituiti sintetici delle componenti ematiche. Tuttavia l'utilizzo sicuro della terapia trasfusionale richiede la conoscenza dei gruppi sanguigni e della prevalenza anticorpale, mediante l'impiego di donatori

adeguatamente selezionati e test di screening per rilevare le incompatibilità sierologiche (Lanevski, 2001).

Negli animali domestici esiste infatti un'ampia varietà di gruppi sanguigni e sempre più frequentemente continuano ad essere scoperti nuovi antigeni, rendendo più complicato il quadro della compatibilità tra individui; e non è raro dover avere a che fare con soggetti che hanno già ricevuto almeno una trasfusione in passato. Fortunatamente sono disponibili rapidi e affidabili test "point-of care" per saggiare il gruppo sanguigno e la compatibilità donatore-ricevente (o cross-matching). Questi test pre-trasfusionali sono essenziali per garantire l'efficacia della trasfusione e minimizzare il rischio di reazioni avverse, immediate o ritardate: nonostante si tratti di pratiche salva-vita, le trasfusioni possono infatti generare effetti collaterali, anche pericolosi per la vita del paziente ricevente (Lanevski, 2001; Giger, 2007; Tocci, 2009; Tocci, 2010).

Il primo step dei test pre-trasfusionali consiste nella raccolta, in modo corretto, di un campione di sangue per evitare emolisi artefattuale: ogni campione dovrebbe essere identificato in modo univoco mediante nome dell'animale, cognome del proprietario, codice di registrazione del campione, data del prelievo e specie. Il campione prelevato viene raccolto in una provetta con EDTA per la tipizzazione del gruppo sanguigno, altrimenti in una provetta di separazione del siero e successivamente centrifugato per il cross-matching test. Tuttavia, attualmente, la maggior parte delle unità stoccate di globuli rossi o sangue intero presenta dei segmenti aliquotati ad esse collegate da cui ricavare il campione. Nella maggior parte dei casi i test pre-trasfusionali possono essere eseguiti ore o anche giorni prima della trasfusione; tuttavia, sulla base della linea guida in medicina umana, possono esserci delle situazioni in cui non devono trascorrere più di tre giorni dal prelievo, soprattutto per l'esecuzione del cross-matching test: animali con anamnesi di gravidanza e/o precedenti trasfusioni, e in generale qualsiasi condizione che può stimolare una produzione anticorpale. La produzione di anticorpi infatti insorge nel giro di 3-4 giorni dall'esposizione e si mantiene rilevabile per anni: lo scopo è riflettere lo stato immunologico corrente del paziente (Tocci, 2009).

1.21 GRUPPI SANGUIGNI

I gruppi sanguigni sono determinati da markers genetici specie-specifici, ovvero antigeni di natura glicoproteica o glicolipidica esposti sulla superficie della membrana cellulare degli eritrociti e trasmessi nella discendenza secondo la legge mendeliana della dominanza.

Ogni antigene infatti è determinato da un gene dominante (Lanevski, 2001; Wardrop, 2007; Giger, 2009; Lubas, 2011 ; Carli, 2013).

Tali antigeni sono coinvolti nel meccanismo di riconoscimento del “self” o tolleranza immunologica e, qualora introdotti nel circolo di un soggetto in cui sono assenti (quindi incompatibile), stimolano la produzione di anticorpi anti-eritrocitari circolanti appartenenti alle classi IgG e IgM. In un soggetto ricevente questi anticorpi sono naturalmente presenti in circolo sin dalla nascita o vengono indotti da una precedente trasfusione con sangue antigenicamente incompatibile (fenomeno della sensibilizzazione). La loro presenza assume una rilevanza notevole nella pratica trasfusionale perché, nel caso di esposizione a sangue incompatibile, l'interazione con gli antigeni dei globuli rossi trasfusi determina l'insorgenza di reazioni avverse: lievi, con drastica riduzione della sopravvivenza in circolo delle emazie trasfuse e quindi dell'efficacia della trasfusione, ma anche gravi con emolisi dei globuli rossi, mediata dalle IgM e dalla fissazione del complemento. (Lanevski, 2001; Abrams – Ogg, 2004; Giger, 2009; Tocci, 2010).

La gravità della reazione emolitica dipende da vari fattori, tuttavia vi sono due elementi chiave da considerare: per un certo tipo di anticorpo, generalmente la reazione è più grave quando il titolo è più elevato; in secondo luogo le reazioni mediate da IgM tendono ad essere più gravi delle reazioni mediate dalle IgG a causa di una maggiore attività di fissazione del complemento. Una reazione trasfusionale emolitica può avvenire sotto forma di crisi intravascolare acuta, per attivazione del complemento da IgM o alti titoli di IgG, o come evento emolitico extravascolare ritardato, dovuto al legame delle IgG sugli eritrociti (Abrams – Ogg, 2004).

A partire dalla loro scoperta si sono susseguite, nel corso del tempo, numerose modalità di definizione e classificazione dei gruppi sanguigni canini. Attualmente i gruppi sanguigni della specie canina ufficialmente riconosciuti sono inseriti e classificati all'interno del sistema DEA (Dog Erythrocyte Antigen) in cui, per convenzione, ognuno viene indicato dall'acronimo DEA e un numero indicante il locus genico corrispondente e, ove necessario, il numero dell'allele: DEA 1 (costituito da 4 alleli e suddiviso a sua volta in DEA 1.1 - 1.2 - 1.3), DEA 3 (frequente nelle razze orientali), DEA 4, DEA 5, DEA 6, DEA 7 e DEA 8. La loro caratterizzazione in vitro avviene attraverso l'impiego di antisieri specifici standardizzati a livello internazionale, anche se gli antisieri per DEA -6 e DEA 8 non sono largamente disponibili (Hohenhaus, 2004; Andrews, 2006; Wardrop, 2007; Tocci, 2009 ; Tocci, 2010 ; Kessler, 2010 ; Carli, 2013; Davidow, 2013 ; Kisielewicz, 2014).

La prevalenza dei diversi gruppi sanguigni dipende molto dalla localizzazione geografica delle popolazioni testate (Gracner,2007; Ekiz,2011; Ferreira,2011; Kisielewicz,2014): in Italia uno studio eseguito su soggetti donatori del Centro –Nord ha dimostrato una prevalenza di circa 59% DEA 1 negativo, 40% DEA 1 positivo, 100% DEA 4 positivo e 33% DEA 7 positivo (Spada, 2015).

L'antigene DEA 1 inoltre mostra una prevalenza molto variegata anche tra le varie razze (Gracner,2007; Ekiz,2011;Ferreira,2011 ; Kisielewicz,2014) : in Italia le razze a maggior prevalenza DEA 1 positivo sono Dogo (100%), Doberman (92%), Pastore Tedesco (90%), Boxer (80%) Corso (72%) ; al contrario le razze a maggior prevalenza DEA 1 negativo sono Rottweiler (100%), Segugio (100%), Bovaro del Bernese (93%), Setter (86%) e Golden Retriever (75%) (Carli, 2015).

L'antigene DEA 4 è l'antigene più frequente in assoluto, riscontrato in circa 98- 100% dei cani e viene considerato antigene ad alta frequenza (Hoenhaus,2004; Hoenhaus,2006; Hale, 2008; Iazbik,2010; Kessler,2010; Kisielewicz, 2014).

L'antigene DEA 7 (Tr antigene) non è un vero e proprio antigene di membrana,ma si pensa sia prodotto in altri siti dell'organismo, secreto nel plasma e adsorbito alla superficie dei globuli rossi. L'antigene DEA 8 (He antigen) è stato solamente descritto e tuttora non ne è stata evidenziata l'importanza clinica. (Wardrop, 2007; Lubas, 2011; Carli, 2013).

GRUPPO	INCIDENZA	ANTICORPI NATURALI	REAZIONI TRASFUSIONALI
DEA 1.1	45% USA	Non segnalati	Cani DEA1.1/1.2 negativi sensibilizzati con gr DEA 1.1 positivi sviluppano anticorpi che, ad una successiva trasfusione con eritrociti DEA 1.1/1.2 positivi darà rimozione dei globuli rossi trasfusi entro 12-24 ore.
DEA 1.2	20% USA	Non segnalati	Come sopra.
DEA 1.3	Solo Australia	Non segnalati	Non sono stati descritti studi sperimentali di trasfusioni con questo gruppo
DEA 3	6% USA	Riportati nel 20% dei DEA 3 negativi	La somministrazione di globuli rossi DEA 3 positivi ad un cane precedentemente sensibilizzato dà perdita dei globuli rossi trasfusi entro 5 giorni
DEA 4	> 98 %USA	Non segnalati	Da definire. I cani DEA 4 negativi producono anticorpi se trasfusi con globuli rossi DEA 4 positivi. I cani sensibilizzati però, non presentano perdita di eritrociti o emolisi se trasfusi con globuli rossi DEA 4 positivi. E' stata riportata una reazione emolitica dopo trasfusioni ripetute di sangue DEA 4 positivo in un cane DEA 4 negativo.

DEA 5	Bassa	Nel 10% dei cani trasfusi	La trasfusione di DEA 5 positivo ad un cane precedentemente sensibilizzato ha dato sequestro dei globuli rossi e perdita entro 3 giorni.
DEA 6	100% USA	Non documentati	Rapida rimozione dei globuli rossi DEA 6 positivi trasfusi ad un cane DEA 6 negativo precedentemente sensibilizzato.
DEA 7	40 – 54% USA	Anticorpi deboli, a basso titolo, non emolitici nel 20-50% dei DEA 7 negativi.	DEA 7 negativi sensibilizzati con DEA 7 positivi presentano sequestro e perdita di globuli rossi entro 72 ore quando trasfusi con eritrociti DEA 7 positivi.
DEA 8	40 – 45% USA	Sconosciuto	Sconosciuto

Tabella 1.21 - Gruppi sanguigni nel cane secondo la classificazione DEA (Carli, E., Gerou-Ferriani, M., 2013)

Recentemente, in Giappone, è stata proposta una nuova classificazione dei gruppi sanguigni basata su quattro anticorpi monoclonali (Shigeta A, B, D, E) anche se non è chiara la correlazione con la classificazione DEA; solo il gruppo A sembra corrispondere al DEA 3 (Giger,2005; Blais, 2007; Carli, 2013).

In genere ogni gruppo è costituito da 2 alleli, per cui ogni cane può essere positivo o negativo per ognuno dei gruppi costituenti il sistema DEA, ad esempio DEA 4+ o DEA 4- (Hoenhaus,2004; Giger, 2009; Polak, 2015).

Il gruppo DEA 1 rappresenta invece un'eccezione: in passato esperimenti mediante allo-anticorpi policlonali hanno dimostrato la sua suddivisione in 2-3 sottotipi, ovvero DEA 1.1, DEA 1.2 e DEA 1.3. Il sottotipo DEA 1.1 + appariva dominante sul DEA 1.2 +, e a sua volta il DEA 1.2 appariva dominante sul DEA 1.3: per questo motivo un soggetto DEA 1.1 – poteva essere DEA 1.2 +, e solo un DEA 1.2 – poteva essere DEA 1.3 +. Recenti studi realizzati con un anticorpo monoclonale murino anti – DEA 1 ,mediante tecniche di citometria a flusso e immunocromatografia, hanno dimostrato che il legame antigenico è quantitativamente differente tra i vari soggetti, e il gruppo DEA 1 in realtà è un sistema molto complesso ,codificato da un singolo locus genico e costituito da 4-5 alleli con vari livelli di espressione antigenica superficiale : DEA 1 – (0), DEA 1 debolmente positivo (1+), intermedio (2+) e DEA 1 fortemente positivo (3+ e 4 +), per cui un soggetto può essere DEA 1 negativo, debolmente o fortemente DEA 1 positivo (Acierno, 2014 ; Polak 2015; Giger,2016).

Studi sull'ereditarietà dei geni correlati agli antigeni eritrocitari hanno dimostrato un'ereditarietà autosomica dominante non legata al sesso di tutti e 4 gli alleli del gruppo DEA 1, con dominanza degli alleli DEA 1 + (sia fortemente che debolmente) sul DEA 1

negativo, mentre non hanno evidenziato diretta correlazione con l'allele un tempo definito DEA 1.2 +. Una recente indagine realizzata in Nord America ha evidenziato che la maggior parte dei cani presenta gruppo DEA 1 – o fortemente DEA 1 +, è molto più basso invece il numero di soggetti DEA 1 debolmente (1+) o moderatamente (2+) + (Giger, 2016).

La struttura biochimica del gruppo DEA 1 è ancora sconosciuta, tuttavia uno studio di associazione “genome -wide” ha identificato un singolo locus genico (Giger,2016).

Lo studio delle basi genetiche del gruppo DEA 1 è molto importante perchè può aiutare le banche del sangue e le cliniche a selezionare in modo più efficiente ed accurato i donatori canini, inoltre la tipizzazione del grado di positività al DEA 1 può contribuire a migliorare la compatibilità con i riceventi ed evitare le reazioni emolitiche trasfusionali. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per determinare gli effetti di una trasfusione con sangue debolmente DEA 1+ ad un soggetto DEA 1-, oppure da un soggetto fortemente DEA 1+ ad uno debolmente DEA 1+ e quindi, sostanzialmente, se le differenze di antigenicità del sistema DEA 1+ influenzano il grado di sensibilizzazione e di successiva reazione emolitica (Polak, 2015).

Nel 2007 è stato isolato un nuovo antigene privo di correlazione con gli antigeni DEA e denominato “Dal”, perché descritto per la prima volta in un cane di razza Dalmata sensibilizzato da precedenti trasfusioni. In seguito alla sua scoperta l'antigene Dal è stato evidenziato con una frequenza del 93% (altro antigene ad alta frequenza) anche nelle altre razze, come Beagle, Doberman Pinschers e Lhasa Apso; pertanto la sua tipizzazione sta diventando sempre più importante, specie nei soggetti che richiedono trasfusioni multiple. Studi hanno dimostrato che non esistono allo-anticorpi naturali, IgG, contro questo antigene, ma solo indotti nei soggetti Dal negativi da sensibilizzazione con sangue Dal positivo (anticorpi anti – Dal). Test in vitro inoltre hanno evidenziato che tali anticorpi tendono a indurre una riduzione di efficacia della trasfusione, ma possono causare anche una grave emo-agglutinazione e grave reazione trasfusionale, nel caso in cui prodotti trasfusionali Dal positivi vengano ripetutamente somministrati a soggetti Dal negativi. (Hohenhaus, 2004; Blais, 2007; Tocci, 2010; Kessler, 2010; Carli, 2013; Davidow, 2013; Kisielewicz, 2014; Giger,2016).

Uno studio recentissimo realizzato in Corea del Sud mediante due nuovi anticorpi monoclonali murini, ha portato alla scoperta di due nuovi gruppi sanguigni, Kai 1 e Kai 2, determinati da particolari antigeni presenti sulla membrana eritrocitaria. L'indagine genetica su un numero ristretto di famiglie ha dimostrato per Kai 1 un tratto autosomico dominante (J J.H. Lee and H.Y. Kim et al., unpublished data, 2016; Euler, 2016).

Un gruppo di studio ha effettuato lo screening di una popolazione canina per determinare la presenza di questi nuovi gruppi sanguigni anche in Nord America, e ha dimostrato che: nella popolazione canina considerata questi gruppi sanguigni sono presenti e, in particolare, la maggior parte dei soggetti è Kai 1 + (94%) mentre pochissimi sono Kai 2 + (1% anche se gli studiosi coreani riportano una frequenza di Kai 2 + pari al 17% in cani di razza mastiff), pertanto vengono considerati antigeni ad alta e bassa frequenza rispettivamente. La combinazione riscontrata più frequentemente Kai 1 + / Kai 2 -, molto più rara invece la combinazione Kai 1 - /Kai 2- (5%). Allo stato attuale invece non è stata ancora rilevata la combinazione Kai 1+/Kai 2+, per cui molto probabilmente tali antigeni non sono correlati tra loro. Oltre a ciò questa indagine ha evidenziato l'assenza di correlazione di Kai 1/Kai 2 con gli antigeni DEA (in particolare l'antigene DEA 7) o l'antigene Dal,e l'assenza di allo-anticorpi contro di essi, come per il DEA 1. La loro importanza clinica deve essere approfondita (J.H. Lee and H.Y. Kim et al.unpublished data, 2016; Euler, 2016 ; Giger,2016).

Come già anticipato in precedenza, gli antigeni che caratterizzano i gruppi sanguigni sono in grado di determinare un'importante produzione di anticorpi, IgG e IgM, ad azione emo-agglutinante ed emolizzante. Questi allo-anticorpi possono essere naturali, in soggetti mai trasfusi, o indotti da una precedente sensibilizzazione all'antigene "non self". Gli allo-anticorpi naturali sono stati descritti per i gruppi DEA 3, DEA 5, DEA 7 rispettivamente nel 10%, 30% e 50% dei soggetti, e hanno scarso significato clinico perché pare provochino solamente una ritardata rimozione dei globuli rossi trasfusi senza emolisi. Non sono stati identificati invece allo-anticorpi sierici naturali o preformati contro antigeni DEA 1 (Carli, 2013; Davidow, 2013).

Attualmente il sistema DEA 1, con i suoi sottotipi allelici, è considerato il più importante per la medicina trasfusionale perché fortemente antigenico; inoltre la presenza dei sottotipi allelici fa sì che un soggetto possa essere negativo per entrambi o positivo per uno soltanto. A causa della mancanza di allo-anticorpi naturali contro di essi, questi antigeni non determinano una reazione acuta nel ricevente al momento della prima trasfusione. L'esposizione di un soggetto DEA 1.1 negativo a globuli rossi DEA 1.1 positivi induce, nel giro di 10 giorni circa, la cosiddetta "sensibilizzazione", ovvero produzione di anticorpi anti DEA 1.1 responsabili di emolisi ritardata e riduzione della vita media delle emazie trasfuse entro 1-2 settimane. La sensibilizzazione è un fenomeno molto importante da tenere in forte considerazione, in quanto ad ogni eventuale esposizione successiva a sangue DEA 1.1 positivo (ad esempio in caso di trasfusione eseguita alla "cieca" senza la

determinazione del gruppo), nel ricevente si scatena una moderata - grave reazione emolitica acuta con distruzione, entro 12 ore, di tutti gli eritrociti trasfusi e comparsa di segni come emoglobinuria, febbre, orticaria, leucocitosi e trombocitopenia. La situazione è simile per il sangue di tipo DEA 1.2, anche se la reazione è meno grave e la distruzione di tutti gli eritrociti trasfusi avviene entro 24 ore. Inoltre un soggetto DEA 1 negativo e sensibilizzato con eritrociti DEA 1.1 positivi può presentare una reazione emolitica ritardata anche in caso di trasfusione di sangue DEA 1.2 positivo, a dimostrazione della maggiore antigenicità dell'allele 1.1. Per questo motivo DEA 1.1 è l'antigene che viene controllato abitualmente sia nei donatori che nei riceventi. (Lanevski, 2001; Abrams – Ogg, 2004; Gracner, 2007; Wardrop, 2007; Tocci, 2009 ; Tocci, 2010 ; Kohn, 2012 ; Carli, 2013 ;Davidow, 2013; Blois, 2013 ; Mackin, 2013).

Il rilievo di tali reazioni trasfusionali, tuttavia, sembra essere abbastanza infrequente (3 – 13%), probabilmente in relazione alla bassa frequenza di anticorpi naturali clinicamente significativi o, più facilmente, alla scarsa segnalazione di questi episodi. (Lanevski, 2001; Carli, 2013).

Lo stesso meccanismo è alla base anche della malattia emolitica neonatale del cane, in cui una femmina DEA 1.1 negativa ,già sensibilizzata a seguito di una trasfusione con sangue positivo, viene incrociata con un maschio DEA 1.1 positivo e mette al mondo cuccioli DEA 1.1 positivi, in funzione dell'ereditarietà autosomica dominante : subito dopo la nascita i cuccioli assumono gli anticorpi materni anti DEA 1.1 positivi mediante il colostro e vanno incontro ad un fenomeno di marcata emolisi con emoglobinuria, ittero e anche morte. E' necessario sottolineare, tuttavia, che, a differenza della specie umana ed equina, nel cane la gravidanza non sembra indurre la produzione di allo-anticorpi; l'isoeritrolisi neonatale è stata osservata solo sperimentalmente in neonati dopo l'ingestione di colostro, prodotto da madri precedentemente trasfuse con sangue incompatibile prima del parto (Blais, 2009; Kessler, 2011).

Per quanto riguarda l'allele DEA 1.3, cani DEA 1.3 positivi risultano negativi per DEA 1.1 e DEA 1.2 e la trasfusione di sangue DEA 1.3 positivo in cani negativi per i tre alleli del gruppo determina la formazione di anticorpi che reagiscono verso tutti gli alleli. Quindi è possibile che una trasfusione con sangue DEA 1.1 – 1.2 negativo sensibilizzi un cane ricevente DEA 1.1 e 1.2 negativo; per questo motivo si raccomanda sempre di effettuare le prove crociate qualora il ricevente sia già stato trasfuso (Abrams – Oggs, 2004).

In realtà le reazioni trasfusionali si possono osservare in tutti i casi di trasfusione, a soggetti precedentemente sensibilizzati, di globuli rossi non compatibili per tutti gli altri antigeni

(oltre al DEA 1.1) in genere entro 4 giorni dalla trasfusione. E' stata riportata una grave reazione emolitica in un soggetto DEA 4 negativo precedentemente sensibilizzato a seguito dell'esposizione a globuli rossi DEA 4 positivi, anche se il 98% circa della popolazione canina risulta essere positiva (DEA 4 antigene ad alta prevalenza) (Melzer,2003; Blais, 2007; Tocci, 2010).

Fortunatamente la frequenza delle reazioni emolitiche acute post trasfusionali è piuttosto bassa per vari motivi : (1) scarsa rilevanza clinica degli allo-anticorpi naturali al contatto con altri gruppi sanguigni (se non in presenza di sensibilizzazione) ; (2) trasfusioni uniche o al massimo ripetute dopo ridotto lasso di tempo (entro una settimana, rare le trasfusioni continue e prolungate) ; (3) esecuzione del cross-matching test in caso di seconda trasfusione dopo più di una settimana dalla precedente, per selezionare un'unità compatibile ; (4) tipizzazione per DEA 1.1 in tutti i soggetti prima di essere sottoposti a trasfusione, in quanto gruppo maggiormente antigenico e clinicamente rilevante ,e i soggetti negativi ricevono solamente sangue negativo ; (5) mancato riconoscimento di una reazione emolitica acuta o falsamente attribuzione ad una patologia sottostante (Kessler, 2011).

Recentemente alcuni studi sulla compatibilità trasfusionale nel cane, hanno evidenziato una produzione di anticorpi, simili a quelli dei gruppi sanguigni, stimolata dalla presenza di determinate proteine estranee che sono indotte da forme cancerose come osteosarcoma o linfoma, e danno cross-reazione con gli eritrociti del donatore sano (Ognean, 2009).

Le trasfusioni allogeniche possono potenzialmente introdurre antigeni estranei nel soggetto ricevente, per questo è importante che vi sia il più possibile compatibilità con il donatore.

Al momento la definizione del cane donatore universale non trova l'accordo dei vari esperti del settore. Secondo la definizione più restrittiva infatti, il donatore universale ideale dovrebbe essere DEA 1.1 – 1.2, DEA 3, DEA 5, DEA 7 negativo e DEA 4 positivo (i soggetti DEA 4 negativi rappresentano esclusivamente il 2% della popolazione canina), altri autori accettano anche DEA 7 positivi. Nella pratica l'ideale sarebbe avere a disposizione solo cani donatori DEA 1.1 negativi; i soggetti DEA 1.1 positivi dovrebbero donare esclusivamente a riceventi DEA 1.1 positivi, per prevenire la sensibilizzazione verso tale antigene. In linea generale, al momento della trasfusione, dovrebbe essere sempre eseguita la determinazione almeno dell'antigene DEA 1.1 nel donatore e anche nel ricevente. Nei soggetti che abbiano già ricevuto una precedente trasfusione, oltre alla determinazione del gruppo DEA 1.1, è necessario eseguire anche il test cross matching (Wardrop, 2007; Tocci,2009; Tocci, 2010; Carli, 2013; Agnoli,2015).

Teoricamente si consiglia di eseguire abitualmente sia la tipizzazione che il cross matching test e non sottovalutare un'incompatibilità al cross match nonostante una compatibilità di gruppo sanguigno (Wardrop,2007).

1.22 DETERMINAZIONE GRUPPO SANGUIGNO

I test pre-trasfusionali, quali tipizzazione del gruppo sanguigno e cross matching, sono stati messi a punto per: incrementare l'efficacia della trasfusione, assicurando un'ottimale durata dei globuli rossi; prevenire trasfusioni con sangue incompatibile e minimizzare i rischi di reazioni avverse, in particolare una reazione emolitica in corso o post-trasfusione; prevenire l'isoeritrolisi neonatale (Lanevski, 2001; Giger, 2009; Blois,2013).

Nello specifico il test di tipizzazione del gruppo sanguigno permette al Medico Veterinario di identificare il gruppo sanguigno del paziente e/o di un candidato donatore e garantire la somministrazione di sangue antigenicamente compatibile. In linea teorica la tipizzazione per l'antigene DEA 1.1 dovrebbe essere eseguita sempre prima di una trasfusione, sia nel donatore che nel ricevente e sia nel cane che nel gatto, in quanto l'antigene DEA 1.1, (presente in almeno il 50% della popolazione canina) si associa alla produzione di anticorpi e ad eventuali reazioni trasfusionali importanti nei soggetti sensibilizzati. Nella pratica, trattandosi spesso di situazioni di emergenza, la tipizzazione viene eseguita soltanto per selezionare i soggetti donatori; qualora il ricevente abbia già ricevuto una trasfusione in precedenza è necessario eseguire non solo la tipizzazione ma anche un test di cross-matching per valutare la compatibilità sierologica con il donatore (Abrams – Ogg, 2004; Wardrop,2007; Carli, 2013; Davidow,2013; Kisielewicz,2014).

Nelle condizioni di urgenza il veterinario deve mettere a confronto il rischio di trasfondere un sangue non testato per la compatibilità e il rischio di ritardare la trasfusione; in genere si preferisce somministrare, se disponibile, sangue DEA 1.1 negativo, in funzione dell'assenza di anticorpi naturali contro gli antigeni eritrocitari maggiormente coinvolti nelle reazioni emolitiche immediate (Tocci, 2009; Davidow, 2013).

Il principio su cui si basano i test per la tipizzazione del sangue, sia in umana che in veterinaria, è l'identificazione sierologica mediante una visibile reazione di em-agglutinazione tra gli antigeni esposti sulla superficie dei globuli rossi del ricevente e un reagente a base di antisieri monoclonali o policlonali standardizzati (Lanevski, 2001; Tocci, 2010; Carli, 2013).

L'agglutinazione consiste in un'aggregazione, mediata da anticorpi, di cellule che esprimono antigeni sulla propria superficie ; è reversibile perché si instaurano legami

intermolecolari deboli , specifica grazie alla stretta complementarità tra le strutture reattive degli antigeni e dei rispettivi anticorpi, e si sviluppa in due fasi : una prima fase di sensibilizzazione in cui gli anticorpi si attaccano alla superficie dei globuli rossi ,e una seconda fase di reticolazione o “ cross-linking” con formazione di ponti, ad opera degli anticorpi, tra i globuli rossi sensibilizzati .Si forma così un reticolo o “lattice” che si deposita sul fondo e determina la visualizzazione del fenomeno. Per permettere la sensibilizzazione è necessario che antigeni e anticorpi siano tra loro in proporzioni ottimali (fenomeno prozona e postzona) e, soprattutto, che ci sia un sufficiente ravvicinamento delle emazie tra loro,per permettere la formazione successiva dei ponti ; per la reticolazione è necessario che gli anticorpi siano in grado di legarsi ciascuno a due eritrociti. Anche la comparsa di emolisi viene considerato un risultato positivo, perché dimostra l’attivazione della cascata del complemento da parte del complesso antigene –anticorpo (Tocci, 2010; Lubas, 2011).

Nel cane la tipizzazione del gruppo DEA 1.1 si può eseguire con varie metodiche che impiegano antisieri monospecifici in preparazione liquida : (1) tecnica con vetrino a orologio o porta-oggetto con pozzetto ,test grossolano che può dare falsi positivi o negativi e comporta l’uso di discrete quantità di siero ; (2) tecnica con provetta , test piuttosto accurato ma comporta l’impiego di elevate quantità di siero ; (3) tecnica con piastre alveolate o “microtiter” sia per la reazione di agglutinazione che di emolisi ,metodo elettivo perché consente impiego molto limitato di siero e permette una lettura di facile interpretazione sia per l’agglutinazione che per l’emolisi, sebbene sia molto indaginosa (Lubas, 2011).

Recentemente sono stati allestiti dei kit commerciali rapidi e di facile esecuzione per la determinazione del gruppo sanguigno principale sia nel cane (DEA 1.1) che nel gatto (A e B) che, a differenza del test classico di laboratorio, sfruttano anticorpi monoclonali anti DEA 1.1: (1) test di agglutinazione rapida su cartine, tuttavia disponibile solo per il gruppo più importante (Kit Rapid Vet-H Canine 1.1, Agrolabo Spa) ; (2) test di agglutinazione in colonne di gel (ID-Gel Test Canine DEA 1.1 Dia-Med-Vet) non più disponibile in commercio ; (3) tecniche basate su reazioni immunocromatografiche, come il test rapido di agglutinazione su membrana (Quick -LabTest DEA 1.1, Alvedia o il Rapid Vet H - IC). In tutti i casi per l’esecuzione del test è necessario utilizzare campioni di sangue intero in K₃EDTA o, in alternativa, anche in citrato, eparina o CPD-A; qualora sia presente pre - agglutinazione macro-microscopica, occorre lavare per almeno 3 volte i globuli rossi del cane da testare con soluzione fisiologica, se tale agglutinazione persiste anche dopo il

lavaggio (agglutinazione vera) non è possibile eseguire la determinazione del gruppo sanguigno. (Lanevski,2001; Tocci, 2009; Lubas,2011;Seth,2012;Kohn,2012; Giger,2013 ; Carli, 2013 ; Davidow, 2013 ; Blois, 2013 ; Agnoli,2015) .

Sono in corso ricerche per estendere la tecnica di agglutinazione in gel anche per la tipizzazione degli altri gruppi sanguigni, recentemente sono stati introdotti test commerciali per DEA 3 e DEA 5 (Davidow, 2013).

Il test commerciale di agglutinazione rapida su cartine Rapid VET - H®- Canine 1.1, Agrolabo consiste in una particolare “cartolina” con 3 pozzetti, su due dei quali è adsorbito l’anticorpo monoclonale murino anti DEA 1.1 liofilizzato (successivamente ricostituito grazie al diluente), mentre il terzo serve come controllo per evidenziare eventuali fenomeni di auto-agglutinazione. E’ il test maggiormente impiegato nella pratica clinica perché economico, immediato, molto semplice da eseguire e interpretare: porre 50 µl di PBS nel pozzetto di controllo (Auto-agglutination Saline Screen) e ruotare dolcemente per ricoprire tutto la superficie del pozzetto ; aggiungere 50 µl (una goccia semplicemente) di sangue intero di controllo (facendo attenzione che contenga cellule stabili e non sviluppi emolisi) per verificare l’assenza di auto - agglutinazione (se presente procedere al lavaggio del campione) ; disporre 50 µl di PBS nel pozzetto DEA 1.1 Positive Control e altri 50 nel pozzetto Patient Test; ruotare sempre dolcemente per ri-sospendere l’anticorpo monoclonale adeso ; aggiungere 50 µl di sangue di controllo positivo nel pozzetto DEA 1.1 Positive Control e ruotate per miscelate le due componenti sino ad ottenere una reazione di agglutinazione necessaria come controllo di positività ; ripetere la stessa operazione anche nel pozzetto Patient Test e attendere il risultato. La comparsa di una reazione di agglutinazione simile a quella del pozzetto Positive Control è indicativa di positività (Lanevski,2001; Tocci, 2009; Lubas, 2011).

Questo test presenta anche degli svantaggi tra cui : mancata conservabilità legata alla rapida asciugatura ; interpretazione soggettiva e spesso dubbia (soprattutto risulta difficile distinguere un risultato negativo da uno lievemente positivo) ; riscontro di falsi negativi nei soggetti anemici con Hct < 10% per la carenza di eritrociti (sarebbe opportuno ripetere il test senza PBS o utilizzando campione centrifugato), ma soprattutto falsi positivi nei campioni auto-agglutinanti (ad esempio in presenza di anemia emolitica immunomediata) o appartenenti a soggetti appena trasfusi, per la presenza transitoria degli antigeni eritrocitari del donatore (Abrams- Ogg, 2004 ; Lubas, 2011; Seth,2012 ; Agnoli, 2015).

Inoltre diversi studi hanno dimostrato che questo kit può dare anche una debole reazione con sangue DEA 1.2 positivo (Giger, 2005; Kohn,2012)

Questo è un fattore molto importante, perché potrebbe portare all'erronea trasfusione di sangue DEA 1.1 + a ricevente – che è stato falsamente valutato come positivo. Anche per questo motivo in genere si preferisce testare i donatori piuttosto che i riceventi (Lanevski, 2001).



Figura 1.221- Rapid Vet-H Canine DEA 1.1 ([www. agrolabo.it](http://www.agrolabo.it))

Il test immunocromatografico Quick- LabTEST Dea 1.1 Alvedia ® è molto semplice, veloce ed affidabile, è stato introdotto nel 2007 e sfrutta lo stesso anticorpo presente nell'ID – Gel Test. Il principio su cui si basa è la migrazione dei globuli rossi su una membrana, per effetto di un flusso di buffer che la attraversa per capillarità. Per eseguire il test si mettono 3 gocce di diluente nei pozzetti di una piastra fornita dal kit, dopodiché una striscia di carta assorbente, parte del kit, viene inserita prima nella provetta con il sangue non coagulato e poi nel pozzetto con il diluente, dove rimane almeno 15 secondi per sospendere i globuli rossi ; l'estremità della striscia, impregnata con anticorpo monoclonale specifico anti DEA 1.1, e la striscia di controllo contenente lecitina (che dovrebbe trattenere qualsiasi globulo rosso) rimangono a contatto con la sospensione di globuli rossi per circa 2 minuti, tempo necessario a garantire la diffusione dei globuli rossi per tutta la striscia. Alla fine la striscia viene inserita in un supporto per la lettura immediata: la membrana su cui sono stati adsorbiti gli anticorpi lega e trattiene i globuli rossi positivi, per cui la positività è segnalata dalla comparsa di una banda sulla parte centrale della membrana, in corrispondenza della scritta "DEA 1.1" sul supporto. Nei campioni negativi questa banda

ovviamente non compare. Durante l'esecuzione del test deve sempre comparire una banda di controllo nella parte più alta della membrana in corrispondenza della scritta "C", altrimenti è necessario ripetere il test (Kohn,2010; Seth, 2012)

Studi hanno dimostrato una specificità del 100% e una sensibilità del 93% e, in confronto al test di agglutinazione su cartina, una performance ottima (Seth, 2012).

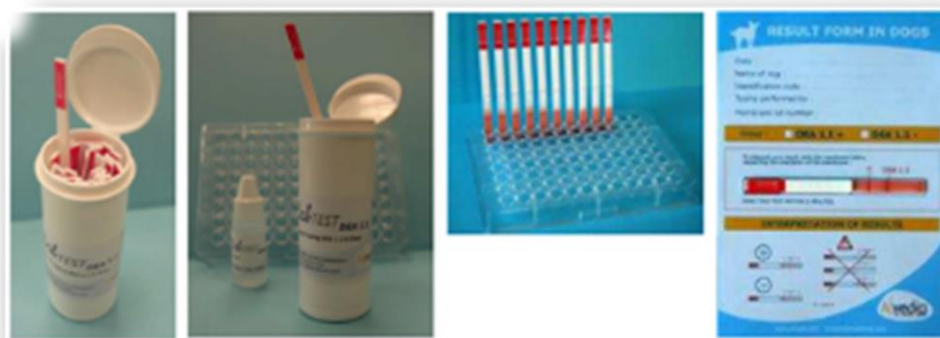


Figura 1.222 - Quick- Lab Test® (www.alvedia.com)

Uno studio recente ha confrontato questi test sia su cani sani che su cani malati e nella maggior parte dei casi ha riscontrato concordanza dei risultati; il test di agglutinazione su gel presenta un'accuratezza del 100%, il test di agglutinazione su cartina tra l'89 e il 91% di accuratezza a causa del fattore soggettività nell'interpretazione, infine il test immunocromatografico presenta 93% di accuratezza e 100% di specificità. Gli errori sono stati riscontrati maggiormente in campioni di cani malati, in particolare con IMHA ; la differenza principale tra questi kit commerciali risiede nel fatto che l'agglutinazione su colonne di gel o il Rapid Vet-H possono essere ostacolati da auto-agglutinazione o presenza di patologie come l'IMHA (anche se il test su gel risente in modo inferiore rispetto al Rapid Vet), il Quick- Lab Test invece non viene influenzato perché i globuli rossi già agglutinati non si muovono lungo la striscia. E' necessario sottolineare, tuttavia, che il test di

agglutinazione su gel e il test immunocromatografico sfruttano lo stesso anticorpo, ma nonostante questo è stata riscontrata una minore sensibilità del test immunocromatografico rispetto all'altro a causa dell'influenza negativa su di esso della condizione di anemia; un ridotto valore PCV infatti indebolisce l'intensità della banda di positività sulla cartina (non ha effetti particolarmente marcati invece sulla banda di controllo. Da un punto di vista pratico sarebbe possibile incrementare la sensibilità di questo test in presenza di un campione anemico, utilizzando sangue a cui è stata tolta una certa quantità di plasma per concentrare gli eritrociti all'interno del range PCV fisiologico (Seth,2012).

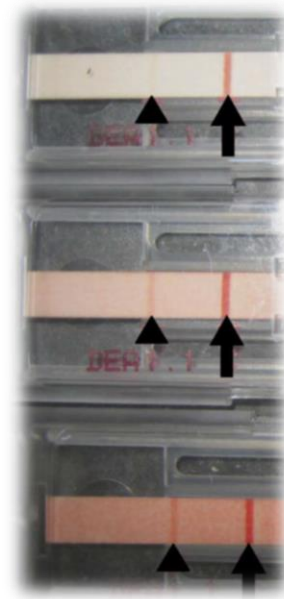


Figura 1.223- Effetto dell'alterazione nel PCV sul risultato di un campione DEA 1.1 positivo mediante test immunocromatografico – The effect of alterations in PCV on results for a DEA 1.1–positive sample blood typed by use of the immunochromatographic cartridge method (Seth,2012)

L'obiettivo della tipizzazione del gruppo DEA 1.1 è evitare la somministrazione di sangue DEA 1.1 positivo a soggetti negativi. La specificità di un test è la caratteristica più importante per la tipizzazione dei riceventi perché l'utilizzo di un test con scarsi o nessun risultato falso positivo, come il metodo immunocromatografico o il test di agglutinazione su gel, può impedire la somministrazione di sangue DEA 1.1 positivo ad un ricevente negativo ; in sostanza per la tipizzazione dei riceventi è meglio ricorrere a test che presentano falsi negativi piuttosto che falsi positivi, in quanto dal punto di vista della sicurezza è meglio che un soggetto DEA 1.1 positivo riceva sangue negativo. (Seth, 2012; Davidow, 2013). Contrariamente la sensibilità è il parametro più importante nello screening dei donatori, in quanto un test con pochi o nessun risultato falso negativo, il test di agglutinazione su gel o

il Rapid Vet, impediscono l'errata identificazione di sangue DEA 1.1 positivo come negativo (Seth,2012).

I kit commerciali per la tipizzazione del gruppo sanguigno sono standardizzati e relativamente semplici da eseguire; sia il test di agglutinazione su cartina che il test immunocromatografico sono venduti in kit comprendenti tutto il materiale necessario, relativamente economici, rapidi , semplici da realizzare e, soprattutto, sufficientemente accurati per la tipizzazione del gruppo nei soggetti riceventi, ma presentano minore accuratezza rispetto al test di agglutinazione su gel che invece sono maggiormente costosi, scarsamente disponibili in commercio e richiedono una tempistica più lunga a causa dei vari passaggi. In conclusione il test di agglutinazione su cartina ha una buona sensibilità per il gruppo DEA 1.1 ma il risultato è vincolato alla soggettività di interpretazione, pertanto si ritiene maggiormente adatto per lo screening dei soggetti donatori all'interno dei programmi di donazione ; il test immunocromatografico ha un'ottima specificità in e richiede tempistiche molto ridotte, e questo lo rende idoneo allo screening dei pazienti in situazioni di emergenza o per testare sangue con agglutinazione ; il test di agglutinazione su gel può essere considerato lo standard di riferimento e quindi utile per confermare il gruppo sanguigno di un soggetto (Seth,2012).

In caso di campione del donatore inconcludente o risultato dubbio ed è consigliabile impiegare test alternativi o affidarsi ad un laboratorio esterno di referenza, in condizioni di emergenza si considera direttamente il campione DEA 1.1 positivo in modo da prevenire la sensibilizzazione di un soggetto DEA 1.1 negativo ; qualora il campione inconcludente sia del ricevente allora il soggetto deve necessariamente ricevere solo sangue DEA 1.1 negativo (Giger,2009 ; Kohn,2012 ; Seth, 2012 ; Davidow, 2013).

Nel 2011 è stato introdotto un'ulteriore strumento, il QuickVet®, costituito da cartucce monouso a 3 canali capillari, inserite in un analizzatore dotato di un software che valuta l'agglutinazione testando la capacità del sangue di assorbire e riflettere la luce, influenzata dalla presenza o meno di agglutinazione. Questo test è estremamente rapido (risultato in 5 minuti) diretto da un software, semplice da eseguire, non operatore-dipendente per l'interpretazione, e permette l'archiviazione informatizzata del risultato. Tuttavia è stato dimostrato che campioni emolitici o auto-agglutinanti danno rispettivamente a falsi positivi e falsi negativi (Kohn, 2012). Attualmente il macchinario non è disponibile in commercio. La determinazione del gruppo DEA 1 deve essere eseguita da personale formato e il risultato deve essere documentato (test utilizzato, operatore che ha svolto l'indagine,

documentazione fotografica del risultato) e allegato alla scheda del cane donatore (Lubas, 2015).

La tipizzazione degli altri gruppi sanguigni risulta difficile per la limitata disponibilità di reagenti idonei all'esecuzione dei test e per la difficoltà nell'interpretazione dei risultati. Attualmente l'unica procedura impiegata per la tipizzazione degli altri gruppi DEA 3,4,5 e 7 è l'agglutinazione su colonne di gel, anche se studi sperimentali hanno dimostrato pari efficacia dei kit commerciali, in particolare l'ID Gel Test che, in relazione, è più facile da interpretare. L'utilizzo del test di agglutinazione su gel è risultato essere particolarmente utile per lo screening degli antigeni DEA 4 e Dal in quanto antigeni ad elevata frequenza e potenzialmente associati all'insorgenza di reazione emolitica acuta (Kessler, 2011; Carli, 2013).

1.23 CROSS MATCHING TEST o PROVA DI COMPATIBILITA' CROCIATA

Il cross-matching è un test che valuta la compatibilità sierologica tra ricevente e donatore, individuando la presenza di anticorpi naturali o indotti da una precedente trasfusione che possono provocare emo-agglutinazione o emolisi, reagendo con i globuli rossi (Tocci, 2009; Carli, 2013).

Questo test non identifica il gruppo sanguigno, ma svela un'eventuale incompatibilità sierologica tra il candidato donatore e il paziente, e non previene necessariamente successive sensibilizzazioni nel ricevente: per questo motivo i soggetti precedentemente trasfusi devono essere sempre sottoposti a prove di compatibilità pre- trasfusionali, anche quando ricevono sangue da uno stesso donatore, e non sono considerati idonei come donatori (Lanevski, 2001; Tocci, 2010; Agnoli, 2015).

Il test cross-matching può essere realizzato insieme alla tipizzazione o in sua sostituzione quando essa non è disponibile, tuttavia nel cane si raccomanda di eseguirlo sempre, non tanto alla prima trasfusione, in cui il rischio di reazioni avverse è piuttosto ridotto, quanto nei soggetti politrasfusi, o se non si conosce il gruppo DEA 1. Nello specifico si raccomanda nei casi di: anamnesi trasfusionale muta, anamnesi di reazione emolitica durante la prima trasfusione, seconda trasfusione oltre 3-4 giorni dalla precedente, gruppo DEA 7 del soggetto sconosciuto. In passato il cross-matching test veniva consigliato nei cani gravidi, tuttavia uno studio recente ha dimostrato che la gravidanza non sembra sensibilizzare l'animale agli antigeni eritrocitari (Blais, 2007; Davidow, 2013; Agnoli, 2015).

L'esecuzione può essere fatta in vari modi, similamente alla tipizzazione dei gruppi sanguigni ma senza l'impiego di anticorpi noti per identificare antigeni eritrocitari specifici. Si distinguono test di cross-matching completi e rapidi. I test completi svelano anticorpi anti-DEA 1.1, 1.2, 1.3, 3, 5, 7, vengono eseguiti a 37°C, a temperatura ambiente (circa 25°C) e a 4°C, e includono anche l'impiego di un reagente anti-globulinico (test di Coombs indiretto); di solito i campioni vengono inviati a laboratori di riferimento a causa della complessità e dei costi di esecuzione, legati soprattutto a particolari reagenti. Le prove crociate complete sono scientificamente consigliate in tutti i casi, anche qualora siano noti i gruppi sanguigni sia del donatore che del ricevente, dal momento che i gruppi sanguigni del cane non sono stati completamente caratterizzati. Tuttavia non è stata sufficientemente dimostrata l'utilità di eseguire di tali prove all'interno delle strutture veterinarie, dove la maggior parte delle trasfusioni si effettuano in situazioni di emergenza; inoltre la loro realizzazione non quasi mai è economicamente e praticamente fattibile. Pertanto nella pratica clinica quotidiana si realizzano senza problemi le prove crociate rapide. Le prove crociate rapide vengono eseguite a temperatura ambiente e omettono l'esecuzione del test anti-globulinico, possono essere adottate diverse metodiche, sono veloci e poco costose, pertanto effettuabili in qualsiasi struttura veterinaria. A differenza di quelle complete, le prove crociate rapide svelano solamente gli anticorpi anti – RBC presenti in titolo così elevato da provocare clinicamente una reazione emolitica moderata – grave. (Abrams – Ogg, 2004).

Il cross matching test consiste in due prove: la prova crociata major e la prova crociata minor. La prova minor è stata ritenuta da molti studiosi meno importante rispetto alla major a causa della diluizione degli anticorpi del donatore nel ricevente (Abrams – Ogg, 2004; Giger, 2009; Mackin, 2013).

Il campione di partenza, sangue intero in K3 EDTA, viene centrifugato per ottenere globuli rossi che vengono lavati numerose volte con soluzione salina, messi in sospensione 2- 4%, e incubati a 37° con eguale quantità di siero/plasma del ricevente o del donatore (a seconda della prova) su : vetro ad orologio, un vetrino portaoggetti con pozzetto o semplice (metodo rapido), piastra microtiter o infine su una provetta. L'utilizzo del plasma risulta conveniente ma nel cane si preferisce ricorrere al siero, perché la presenza del fibrinogeno e di altre proteine plasmatiche incrementa la comparsa di impilamento. A tal proposito è sempre importante: valutare che il campione non presenti emolisi o emo-agglutinazione spontanea, perché altrimenti il test non è eseguibile; preparare un controllo miscelando plasma e sospensione di globuli rossi provenienti dallo stesso soggetto. La tecnica standard di cross

matching in provetta comporta lunga tempistica di attesa e interpretazione piuttosto complessa per i clinici. Recentemente è stata sviluppata la tecnologia del cross matching su gel che presenta numerosi vantaggi: procedura standardizzata, rapida, facilmente interpretabile; permette la conservazione del gel e la lettura anche da altri operatori come conferma (interpretazione sempre operatore-dipendente); richiede minore quantità di sangue rispetto alla tecnica standard. Inoltre il test su gel può essere usato anche in presenza di auto-agglutinazione: il gel fa sì che i globuli rossi auto-agglutinati rimangano intrappolati nella matrice, mentre quelli liberi migrano su fondo, permettendo una interpretazione più facile del risultato. Il sistema a gel è stato realizzato sia per la prova major che per la minor ma attualmente non è reperibile in commercio (Abrams – Ogg, 2004; Wardrop, 2007; Lubas, 2011; Davidow, 2013).



Figura 1.23 - Test cross -matching su gel (www.rapidvet.com)

Uno studio pubblicato recentemente ha dimostrato che il test su gel difficilmente riesce a identificare microagglutinzioni e lieve grado di emolisi, e questo può comportare l'insorgenza di reazioni trasfusionali se questo test viene impiegato come unico test di compatibilità prima di una trasfusione. Pertanto la tecnica standard rimane il “gold standard” per determinare la compatibilità donatore-ricevente (Guzman, 2016; Villarnovo, 2016).

La prova crociata major svela la presenza di anticorpi nel ricevente contro gli eritrociti del donatore e determina la compatibilità tra i globuli rossi del donatore e il siero del ricevente, l'eventuale positività con comparsa di agglutinazione/emolisi indica incompatibilità e il donatore non può essere impiegato per la donazione: più è forte la reazione di compatibilità crociata e più grave sarà la sintomatologia clinica dopo la trasfusione (Abrams –Ogg, 2004; Tocci, 2009; Tocci,2010). Questa incompatibilità incorre se il ricevente presenta anticorpi naturali o indotti, diretti contro gli antigeni eritrocitari dei donatori. Se non c'è emo-

agglutinazione o emolisi il cross match è considerato compatibile e il donatore viene accettato. La prova crociata minor invece rivela la presenza di anticorpi nel donatore contro gli eritrociti del ricevente e quindi determina la compatibilità tra il plasma del donatore e i globuli rossi del ricevente: la trasfusione di componenti contenenti plasma (sangue intero o FFP) può potenzialmente provocare la distruzione dei globuli rossi del ricevente se nel donatore sono presenti allo - anticorpi diretti contro gli antigeni eritrocitari del ricevente. In questo caso però il significato della positività dipende dal titolo anticorpale nel donatore e dal volume di plasma trasfuso: se la reazione è forte anche piccoli volumi di plasma del donatore possono determinare una significativa reazione trasfusionale, per cui si esclude l'impiego del donatore a meno che non venga effettuato il lavaggio degli eritrociti. In presenza di reazioni più deboli è possibile la somministrazione del concentrato di eritrociti del donatore, se molto deboli anche di piccoli volumi di plasma. (Abrams – Ogg, 2004; Tocci, 2009; Tocci,2010). Entrambe le prove devono essere negative, tuttavia è importante sottolineare che il risultato negativo di test cross-matching da donatore a paziente non indica che i due soggetti hanno lo stesso gruppo sanguigno, non garantisce la normale sopravvivenza dei globuli rossi né tantomeno elimina i rischi collegati alla trasfusione. Possono verificarsi reazioni ritardate, entro 1 – 2 settimane, provocate dalla produzione di anticorpi anti-eritrocitari subito dopo la somministrazione dell'antigene corrispondente: sfortunatamente prima della trasfusione questi anticorpi sono presenti in titolazioni basse non rilevabili dal cross matching test. Pertanto un cane che ha ricevuto in precedenza una trasfusione compatibile può diventare incompatibile con il sangue dello stesso donatore dopo 1 – 2 settimane. Oltre a questo il cross matching test non può prevenire anche le incompatibilità legate a leucociti, proteine o piastrine: reazioni ritardate ai leucociti o alle proteine plasmatiche del donatore, definite reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche (Lanevski, 2001; Giger,2009; Ognean, 2009; Tocci, 2010)

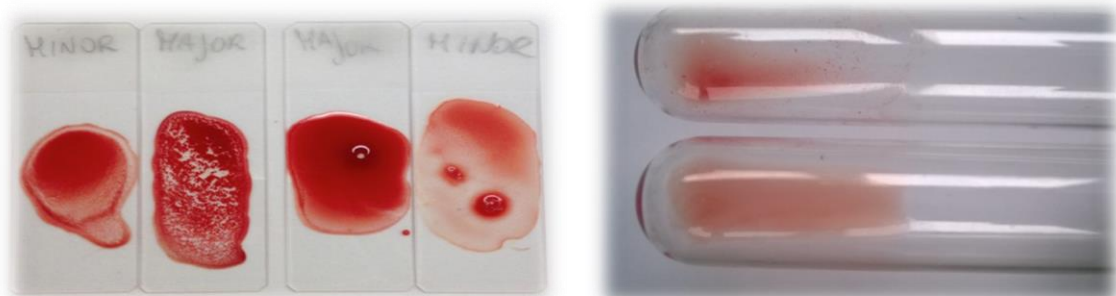


Figura 1.24- Prova Major e Prova minor su vetrino e provetta (Prof.ssa Daniela Proverbio, Università degli studi di Milano)

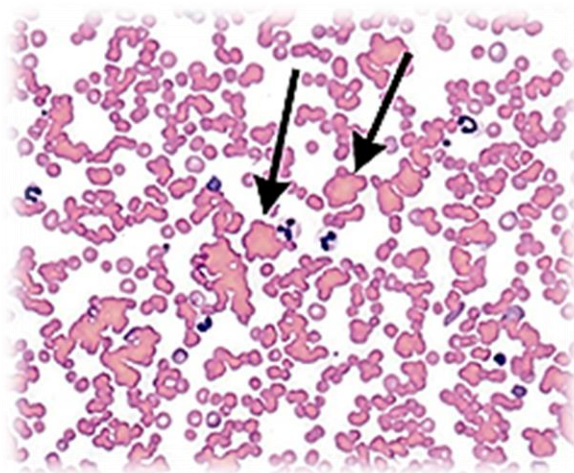


Figura 1.24 -Agglutinazione macroscopica e microscopica ([www. todaysveterinarypractice.navc.com](http://www.todaysveterinarypractice.navc.com))



Figura 1.25 -Tipizzazione del gruppo sanguigno e cross- matching di un soggetto (Prof.ssa Daniela Proverbio, Università degli studi di Milano)

1.3 DONAZIONE DI SANGUE

Attualmente esistono diversi metodi per ottenere prodotti trasfusionali: (1) acquisto, al momento del bisogno, presso una delle ormai numerose banche del sangue sparse sul territorio; (2) accesso a donatori interni; (3) programmi di donazione esterna con cani di proprietà dei clienti o dello staff. Ogni canale di approvvigionamento ha propri vantaggi e svantaggi, la scelta deve essere fatta in relazione alle necessità della struttura. L'acquisto presso le banche del sangue è la scelta probabilmente più indicata per le piccole strutture che non praticano molte trasfusioni, magari anche per l'assenza di un reparto di terapia intensiva, tuttavia presenta diversi inconvenienti come ritardi nella consegna e limitata disponibilità dei prodotti richiesti. Le colonie chiuse di donatori propri della struttura

permettono accesso immediato ai donatori, isolamento dagli altri animali, possibili fomite di malattie infettive, e possibilità di mantenere una costante e prevedibile risorsa di prodotti trasfusionali a cui attingere; tuttavia richiedono il mantenimento degli animali all'interno della struttura e vi è il problema non indifferente del rispetto del benessere animale. I programmi di donazione esterna basati su un parco donatori rappresentano un'attrattiva allettante rispetto alle colonie e ai donatori propri delle strutture; si basano su una rosa di donatori canini di proprietà di clienti, staff o soggetti volontari, di gruppo sanguigno noto e costantemente controllati per le patologie trasmissibili. Questi soggetti possono essere donatori abituali (periodicamente sottoposti a prelievo circa ogni 3 mesi) o occasionali (chiamati solo al momento del bisogno) a seconda delle esigenze. In entrambi i casi, anche per i donatori interni alle strutture, è necessario istituire una lista dei donatori disponibili e affidabili, e un registro delle donazioni contenente le informazioni essenziali: nome, gruppo sanguigno, risultati dei test di screening, date di ogni prelievo, tipo di prodotto ricavato e destinazione, informazioni sul proprietario (in caso di donatore esterno). La struttura veterinaria deve istituire anche un registro trasfusionale contenente le informazioni relative ad ogni trasfusione eseguita: data della trasfusione; donatore; tipo e volume del prodotto trasfusionale impiegato; ricevente; diagnosi; problemi riscontrati durante la trasfusione, ad es. insorgenza di reazioni avverse (Lanevski, 2001; De Luca, 2006).

Ogni centro trasfusionale mette in atto propri metodi di reclutamento, sfruttando tutti i possibili canali di comunicazione disponibili, ad esempio: volantini e annunci su giornali, riviste o affissi negli studi dei medici veterinari o dei centri trasfusionali umani; comunicazione ai proprietari da parte dei veterinari, passaparola tra proprietari dei cani; partecipazione diretta a manifestazioni ed eventi canini sponsorizzati dai centri trasfusionali. Sono necessari e altrettanto importanti i metodi di affiliazione e mantenimento dei donatori, ad esempio in America alcune organizzazioni no-profit basate sul volontariato offrono ai donatori e agli altri animali della sua famiglia un prodotto trasfusionale gratuito per ogni unità ematica donata, nel momento in cui dovessero avere bisogno loro stessi di trasfusione. In genere è sconsigliato ricorrere a incentivi economici, perché si possono creare conflitti di interesse sfocianti nello sfruttamento dei cani donatori (De Luca, 2006).

Presso il Centro Trasfusionale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa dopo ogni donazione al proprietario dell'animale donatore viene regalato un sacco di croccantini.

La donazione di sangue è sempre stata vista con l'ottica altruistica, per cui il beneficio ricavato dal ricevente sovrasta nettamente il sacrificio del donatore che, differentemente, non ne ricava alcun vantaggio diretto e manifesto ; si possono considerare vantaggi lo screening e il monitoraggio periodico gratuito mediante esami del sangue e test sierologici, con comunicazione dei risultati al proprietario e al veterinario curante, fondamentali per impedire /trattare eventuali cronicizzazioni o forme subcliniche altrimenti non rilevabili . Nel corso del tempo è sorto il legittimo problema etico del rispetto del benessere animale in questi programmi, e si è fatta sempre più sentire la necessità di ottenere non solo una fornitura sicura e affidabile, ma anche programmi fondati su standard etici riguardo le cure e il trattamento dei cani donatori. Sono state redatte delle vere e proprie linee guida che definiscono, in modo etico, le condizioni in cui devono essere impiegati i donatori, tra cui anche i limiti del periodo di servizio e la frequenza dei prelievi. I proprietari dei cani donatori credono molto nello spirito altruistico della donazione di sangue e spesso, in una visione antropomorfica dei propri animali, lo estendono anche a loro, spesso senza considerare il “costo” della donazione. La raccolta di sangue per la donazione può provocare spiacevoli effetti collaterali, anche se rari e ulteriormente ridotti dal completo monitoraggio dei soggetti, come comparsa di ematomi o irritazione cutanea. Tuttavia il lato peggiore per il donatore è rappresentato dallo stress per il contenimento e le manipolazioni, si può arrivare al punto in cui il peso emotivo della donazione diventa troppo grande per giustificare l'atto donatorio su un piano altruistico. E' quindi importante cercare di violare il meno possibile non soltanto lo stato di salute ma anche e soprattutto l'equilibrio psicologico ed emotivo del donatore. Gli animali non possono dare il loro consenso informato alla donazione, ma manifestano la loro volontà di collaborare o meno mediante l'esternazione delle proprie emozioni, come tranquillità o al contrario stress e paura. Sarebbe pertanto buona norma escludere dal programma di donazione, per motivi non solo fisici (inadeguato accesso venoso, positività a patologie infettive) ma anche caratteriali, e selezionare soggetti con buon temperamento e adeguata sopportazione dello stress (Ashall, 2009).

La creazione di un gruppo di donatori abituali è consigliata, in quanto consente di: monitorare la salute e il benessere del donatore, attuare la donazione periodicamente, effettuare accertamenti clinici periodici. La donazione programmata inoltre, se eseguita rispettando le indicazioni espresse nelle Linee Guida, non ha effetti negativi sullo stato fisiologico e favorisce la tranquillità del soggetto nei confronti degli operatori e delle manualità che vengono svolte durante la donazione (Lubas,2015).

Nella medicina d'urgenza in genere i prodotti trasfusionali possono essere acquistati presso banche del sangue o raccolti e processati direttamente nella struttura prima della necessità; la pratica delle donazioni programmate facendo ricorso a cani donatori interni o ad un parco donatori esterni non è appropriata in questo campo, per la presenza di vincoli temporali e necessità di manodopera. Tenendo conto della durata di conservazione dei vari prodotti trasfusionali e dell'imprevedibilità delle emergenze, in genere le strutture adibite alla medicina d'urgenza detengono una scorta dei prodotti maggiormente impiegati, che deve essere costantemente tenuta sotto controllo e mantenuta ad un numero di unità pari al 25-50% in più della quota tendenzialmente impiegata in un mese (Rozanski, 2004).

Il Centro Trasfusionale Veterinario del Dipartimento di Scienze Veterinarie si avvale di un parco donatori esterni di specie canina, razze e sesso differenti, reclutati su base volontaria in seguito all'adesione di proprietari privati, mediante firma del consenso informato alla donazione. La selezione iniziale dei cani donatori avviene nel rispetto dei precetti della Linea Guida Ministeriale (dettagliatamente analizzata in seguito): peso corporeo > 25 kg; età 2-8 anni; carattere docile; profilassi vaccinale o copertura immunitaria; regolari trattamenti e/o profilassi nei confronti di endo ed ecto-parassiti, ed utilizzo di presidi repellenti contro artropodi vettori di agenti infettivi (pulci, zecche, zanzare, flebotomi); iscrizione regolare all'anagrafe canina. Ad ognuno di essi viene assegnato un numero di cartella clinica ed un codice di identificazione interno al Centro Trasfusionale.

Al momento della prima visita i soggetti sono sottoposti ad un accurato esame fisico per rilevare le informazioni principali circa il loro stato di salute generale: peso; temperatura corporea; frequenza respiratoria; polso; colore delle mucose; eventuali anomalie rilevate per ogni apparato. I dati raccolti vengono poi trascritti all'interno della cartella clinica informatizzata relativa al cane.

Successivamente si prelevano circa 10 mL di sangue dalla vena cefalica per effettuare, presso il Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato", gli esami previsti dalla Linea Guida Ministeriale: tipizzazione del gruppo sanguigno DEA 1 mediante test rapidi di agglutinazione su cartine (Kit RapidVet-H Canine 1.1® - Agrolabo Spa) e/o su membrana (Quick Test DEA 1.1® - Alvedia); esame emocromocitometrico (sangue intero in K₃EDTA); profilo biochimico (siero); elettroforesi delle proteine (siero) (*Tabella 1.31*). Un'aliquota di sangue intero in EDTA, adeguatamente classificata con nome del donatore e relativo numero di cartella, deve essere congelata e conservata in modo da poter eventualmente ri-eseguire le analisi, ad esempio in caso di reazioni trasfusionali. L'esame fisico e le analisi di laboratorio, ad eccezione della

tipizzazione del gruppo sanguigno, vengono ripetuti ad ogni donazione, allo scopo di tutelare la salute del donatore, escludere la trasmissione di malattie infettive al ricevente e definire qualità – idoneità del sangue raccolto (*Tabella 1.32*). Oltre a ciò i cani donatori sono sottoposti a test sierologico IFA per lo screening di *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma phagocytophilum*, con una frequenza stabilita di due volte l'anno; si ritiene tuttavia opportuno tuttavia ripetere il test ogni qualvolta dall'anamnesi risulti che i soggetti donatori abbiano viaggiato in zone endemiche o manifestino segni clinici potenzialmente compatibili con le malattie. Le indagini di laboratorio consigliate e illustrate nella tabella 1.31 devono essere considerate come indagini minime, da integrare sulla base dell'anamnesi ambientale e di razza (ad. es. dosaggio del fattore di v W nel Dobermann). I criteri applicati per l'esclusione permanente e temporanea dei donatori sono conformi a quelli indicati nella Linea Guida Ministeriale.

Indagini	Analisi
Gruppo sanguigno	DEA 1
Profilo Emocromocitometrico	RCB, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, WBC, formula leucocitaria, PLT, lettura dello striscio da parte di un veterinario esperto, anche per individuare la presenza di emoparassiti.
Profilo Biochimico	Profilo epato -renale, proteico con elettroforesi, sideremico, elettrolitico ed almeno una proteina della fase acuta (ad esempio Proteina C reattiva)
Profilo Coagulativo	PT, a PTT, fibrinogeno
Profilo Urinario	Chimico, fisico e sedimento
Malattie Infettive	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma spp.</i> (sierologia quantitativa) e <i>Babesia spp.</i> (PCR in quanto dimostrata la trasmissione con la trasfusione nel cane)

Tabella 1.31 -Analisi consigliate in fase di arruolamento dei donatori (Lubas, 2015)

Indagini	Analisi
Profilo emocromocitometrico	RCB, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, WBC, formula leucocitaria, PLT, lettura dello striscio da parte di un veterinario esperto, anche per individuare la presenza di emoparassiti.
Profilo biochimico e coagulativo	Proteine Totali, Urea, Creatinina, prove della coagulazione e altri parametri a discrezione
Malattie infettive	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Rickettsia spp.</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia spp.</i> , <i>Anaplasma spp.</i>

Tabella 1.32 -Analisi consigliate ad ogni donazione di sangue (Lubas,2015)

I donatori abituali possono teoricamente donare ogni 3 settimane, se sottoposti ad una buona alimentazione con integrazione di Fe; tuttavia si preferisce impiegarli ogni 3-4 mesi senza supplementi nella dieta, anche per questioni di carattere etico (Abrams- Ogg, 2004; Lubas, 2015).

In genere si richiede al proprietario di tenere l'animale a digiuno per almeno le 8 -12 ore precedenti alla trasfusione, in quanto la lipemia post-prandiale interferisce con la conservazione del sangue nella sacca (Carli, 2013).

In Italia il sangue prelevato deve essere raccolto all'interno di sacche di plastica sterili autorizzate dal Ministero della Salute, che sono le stesse disponibili in commercio per la medicina umana. Queste sacche possono essere da 250, 350 o 450 mL e sono costituite da un ago 16 G a pareti sottili, un deflussore e una sacca in plastica contenente una soluzione anticoagulante – conservante. Le sacche sono realizzate con un tipo di plastica morbida in PVC che presenta numerosi vantaggi: (1) permette lo scambio gassoso delle componenti ematiche (rilascio di CO_2 e incremento dell'ossigenazione); (2) permette ottimizzazione del prelievo e della separazione delle componenti ematiche; (3) riduce i traumi meccanici in fase di raccolta e conservazione; (4) minimizza l'attivazione della coagulazione. Le soluzioni anticoagulanti impiegate nella pratica trasfusionale generalmente contengono citrato (azione anticoagulante mediante chelazione del Ca) con aggiunta di destrosio, fosfato e adenina (ad azione conservante mediante mantenimento del metabolismo glicolitico dei globuli rossi). La sostanza maggiormente impiegata in medicina veterinaria a tale scopo è il CPDA – 1 (citrato-fosfato-destrosio-adenina), vi sono anche il CPD o CPD2 (citrato-fosfato-destrosio) e ACD (acido-citrato-destrosio). L'anticoagulante -conservante ha lo scopo di: (1) impedire la coagulazione ematica; (2) ridurre gli effetti indesiderati della conservazione (*storage lesion*); (3) preservare vitalità e funzionalità dei globuli rossi, soprattutto garantendo adeguate concentrazioni di ATP e di 2,3 DPG. Durante la conservazione del sangue nelle sacche, diminuisce gradualmente la concentrazione di 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), sostanza che riduce l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno e ne favorisce la cessione ai tessuti: conseguentemente il sangue conservato diventa meno efficace nel soddisfare i fabbisogni tissutali di ossigeno rispetto al sangue fresco. E' importante che, indipendentemente dall'anticoagulante impiegato, il rapporto con il sangue sia sempre 1/7 (1ml ogni 9 ml di sangue) per garantire mantenimento ottimale, è consentita una variazione sul riempimento della sacca di $\pm 10\%$ per mantenere un corretto rapporto sangue /anticoagulante. Eparina e citrato non vengono impiegati in campo trasfusionale perché non contribuiscono alla preservazione cellulare nel corso della conservazione

prolungata, qualora siano impiegati il sangue raccolto deve essere utilizzato entro 24 ore. In commercio esistono sacche che, oltre all'anticoagulante, contengono anche sostanze nutritive per prolungare la sopravvivenza degli eritrociti dopo il prelievo e la separazione dal plasma, ad esempio Adsol®, Nutricel®, Optisol®, SAG-mannitolo. (Lanevski, 2001; Carli, 2013; Kisielewicz, 2014; Lubas, 2015).

Sono disponibili anche sacche che consentono la leucodeplezione, ovvero l'allontanamento della maggior parte dei globuli bianchi dal sangue intero appena raccolto mediante apposito filtro integrato (filtrazione pre-storage). La leucodeplezione ha lo scopo di minimizzare il rischio di insorgenza di reazioni post trasfusionali legati ai WBC, reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche, con conseguenti: produzione di chitochine; immunosoppressione; trombocitopenia; danno polmonare acuto, veicolo di agenti patogeni (Lubas, 2015).

La scelta della tipologia di sacca da utilizzare dipende da diversi fattori, principalmente peso-taglia del donatore e tipo di raccolta che si desidera fare (sangue intero, concentrato di eritrociti e plasma). Per la preparazione degli emocomponenti si utilizzano sacche, definite "sacche madri", che sono dotate di una o più "sacche satelliti" vuote collegate alla principale mediante un tubo deflussore. Questo sistema di raccolta viene definito "chiuso" perché impedisce il contatto tra il sangue che defluisce nella sacca e l'ambiente esterno. I sistemi aperti, invece, collegano i vari componenti tra loro mediante membrane perforabili, ed espongono il sangue ad un maggiore rischio di contaminazione microbica; per questo motivo non dovrebbero essere conservati per più di 48 ore (Abrams – Ogg, 2004; Giger, 2009; Carli, 2013).

Si possono quindi distinguere vari tipi di sacche : (1) sacche singole da 350 mL contenenti l'anticoagulante a tre vie di accesso (porte) chiuse da un diaframma; (2) sacche di trasferimento vuote (di vario volume ma in genere da 150 mL) dotate di un tubicino con beccuccio per entrare nella sacca madre mediante una porta e permettere la separazione del plasma in modo "aperto", data l'assenza di collegamento sterile tra le due sacche, con maggior rischio di contaminazione del sangue; (3) sacche doppie da 350 – 450 mL costituite dalla sacca madre per il prelievo e una sacca satellite ,collegate sterilmente tra loro mediante le vie di accesso (sistema "chiuso"); (4) sacche triple da 350 -450 ML costituite da una sacca principale per il prelievo e due sacche satelliti a sistema "chiuso", di cui una vuota per il trasferimento del plasma e una contenente sostanze additive per la conservazione degli eritrociti (Lubas, 2011)



Figura 1.31- Sacche da trasfusione (www.medicalexpo.it)



Figura 1.32- Sacca da leucodeplezione (www.haemonetics.com)



Figura 1.33- www.avismonza.it

Il volume di sangue che può essere donato in tutta sicurezza è pari al 15-20% del volume ematico stimato, calcolato mediante la formula: $0,08 - 0,09 \times \text{peso corporeo in Kg}$; convenzionalmente è stato stabilito che il volume massimo per la donazione è pari a 16-18 mL/kg. Il prelievo di una quota pari al 20% non dovrebbe determinare anemia clinicamente significativa ma, nel breve termine, può comportare ipovolemia; un prelievo superiore al 20% può comportare l'insorgenza di segni di ipovolemia e anemia tali da compromettere la salute del donatore, pertanto dovrebbe essere evitato. Alcuni autori sottolineano che, qualora sia necessario prelevare una quota superiore al 10% del volume ematico totale del donatore, si dovrebbero somministrare soluzioni cristalloidi (NaCl 0,9%) per circa 45-60 minuti dall'inizio della raccolta (non è necessario protrarre oltre il prelievo) per prevenire l'ipovolemia, in quantità pari a 2 -3 volte il volume di sangue che deve essere prelevato, per permettergli di ridistribuirsi tra i comparti intra ed extravascolare. (Abrams – Ogg, 2004; Giger, 2009; Carli, 2013; Mackin, 2013; Lubas, 2015).

La quantità standard di sangue da donare nel cane viene definita “unità canina” ed è stata fissata a 450 ± 45 mL (Abrams –Ogg, 2004; Lubas, 2011), tuttavia nel Centro Trasfusionale dell’Università di Pisa si preferisce raccogliere 350 ± 10 %. La donazione di sangue deve avvenire nel rispetto sia del benessere animale che delle norme di asepsi (Lubas, 2015).

Il sangue deve essere prelevato dalla vena giugulare o cefalica (a seconda della mole del cane e della manualità dell’operatore, sarebbe meglio evitare la cefalica perché lì il flusso ematico è rallentato ed è maggiore il rischio di sviluppare microtrombi) previa tricotomia e disinfezione cutanea, con il soggetto in stazione quadrupedale o in decubito laterale. Il contenimento del cane è manuale perché si preferisce lavorare con soggetti di indole docile per cui non è necessario ricorrere ad una sedazione; qualora sia necessaria la sedazione è bene evitare l’acepromaziona per il suo potenziale effetto sull’attività piastrinica e l’effetto ipotensivo, e preferire il butorfanolo a $0,1 - 0,3$ mg/Kg IM o EV 10-15 minuti prima. E’ possibile applicare sulla cute un gel anestetico 45-60’ prima (Lanevski, 2001; Giger, 2009; Davidow, 2013; Mackin, 2013; Lubas, 2015).

Durante la donazione il proprietario può rimanere accanto al cane, ed è consigliabile la presenza di tre persone: una procede alla venipuntura e alla raccolta del sangue, un’altra contiene l’animale e la terza può partecipare sia al contenimento che alla gestione della sacca. La raccolta del sangue avviene per gravità e grazie alla pressione sanguigna del donatore.



Figura 1.34- Donazione di sangue (repertorio personale)

Durante il prelievo la sacca deve essere fatta oscillare delicatamente per assicurare la miscelazione del sangue con l’anticoagulante, e pesata periodicamente fino al raggiungimento del peso corretto. Nei centri trasfusionali, ad esempio nel Centro Trasfusionale dell’Università di Pisa, sono disponibili bilance basculanti (che contemporaneamente Hemomix plus – Delcon®) pesano e fanno oscillare la sacca, fermandosi automaticamente una volta raggiunto il peso voluto della sacca. Se per qualsiasi

motivo (movimento brusco dell'animale, rottura del vaso, segni di ipotensione..) la quantità di sangue raccolta non è adeguata la sacca deve essere necessariamente eliminata. Tramite il display della bilancia è possibile verificare sia la quantità di sangue raccolta sia la portata del flusso ematico: un flusso rallentato potrebbe provocare aggregazione piastrinica o formazione di coaguli (Lubas, 2015).



Figura 1.35- Bilancia basculante (repertorio personale)

Al termine del prelievo il deflussore viene schiacciato per tutta la sua lunghezza con delle apposite pinze multifunzione (strip) per spingere il sangue residuo all'interno della sacca (nuovamente agitata manualmente), e chiuso mediante nodi (non ottimale), anellini in alluminio o saldature a caldo per sigillare la sacca e impedire il contatto con l'ambiente esterno; è importante ricordarsi di lasciare nel deflussore almeno due aliquote per poter effettuare eventualmente i test di cross-matching. Nel Centro Trasfusionale dell'Università di Pisa la sacca viene chiusa mediante "clampatura", utilizzando anellini in alluminio distanziati circa 10 cm gli uni dagli altri facendo in modo che, all'interno di ciascuna sezione, rimanga del sangue da impiegare per eventuali indagini laboratoristiche. Contemporaneamente sul sito di venopuntura deve essere esercitata una pressione moderata per 2 – 5 minuti mediante cotone imbevuto di acqua ossigenata, per stimolare il normale processo coagulativo. Il cane viene tenuto sotto controllo per circa 15- 30 minuti per valutare l'eventuale comparsa di segni di ipotensione (pallore delle mucose apparenti, modificazione di polso e respiro..), dopodiché è libero di andare e il proprietario può somministrare del cibo (ad eccezione dei soggetti sedati). Informazioni da fornire al proprietario su come comportarsi dopo la donazione: mantenere a disposizione acqua fresca e pulita, mantenere il normale regime alimentare, evitare l'uso di collari a strangolo preferendo le "pettorine", evitare l'esercizio fisico nei giorni successivi. All'interno del Centro Trasfusionale la sacca viene successivamente centrifugata a 3000 rpm per 20 minuti

a 4°C con lo scopo di far sedimentare gli eritrociti. Vi è poi collegata una sacca di trasferimento priva di anticoagulante, destinata a contenere il plasma che viene separato, mediante separatore manuale, quasi interamente (si lasciano circa 10 ml).

Presso ogni centro trasfusionale deve essere predisposto un archivio dei dati che consenta la tracciabilità di ogni sacca di sangue dal prelievo alla destinazione finale, e ogni unità di sangue deve essere etichettata con una serie di informazioni necessarie a tale scopo, indicate all'interno della Linea Guida Ministeriale : nominativo e indirizzo della struttura dove è stata effettuata la donazione ; codice identificativo del donatore con numero progressivo della donazione ; data della donazione ; data di scadenza del prodotto ; tipo di preparato ; gruppo sanguigno del donatore ; valore dell'ematocrito (Hct) ; Volume in mL del preparato ; specie animale di destinazione ; temperatura di conservazione ; dicitura *“esclusivamente per uso veterinario, non utilizzare in caso di emolisi o altre anomalie evidenti. Per la trasfusione utilizzare un adatto dispositivo munito di filtro”* (Lubas,2015).

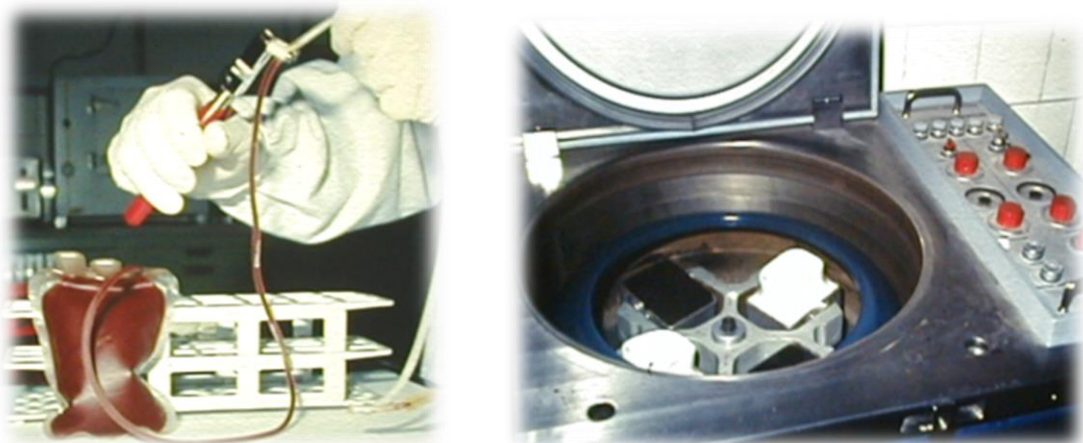


Figura 1.36- Clampatura della sacca di sangue e centrifuga (repertorio personale)

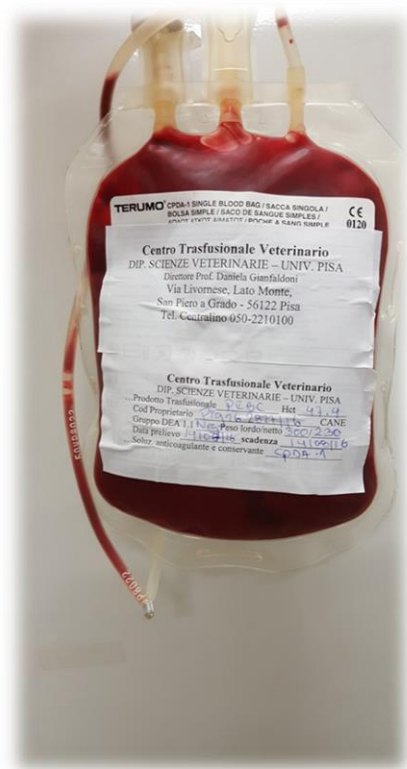


Figura 1.37- Unità di sangue etichettata (repertorio personale)

1.4 PRODOTTI TRASFUSIONALI E INDICAZIONI D'USO

La trasfusione può essere definita come una terapia endovenosa di sangue intero, emocomponenti o emoderivati. Per sangue intero si intende sangue che non ha subito la separazione nei suoi componenti; storicamente la terapia trasfusionale si è basata esclusivamente sul suo impiego e ancora oggi il sangue intero rimane il prodotto più pratico da somministrare in molte strutture veterinarie. I prodotti trasfusionali invece includono gli emocomponenti e gli emoderivati (Abrams – Ogg, 2004).

Gli emocomponenti sono prodotti ottenuti per frazionamento del sangue intero mediante sola separazione fisica, centrifugazione o, meno frequentemente, per aferesi sfruttando le differenti dimensioni e densità dei suoi costituenti; si ottiene così la stratificazione del plasma (nella parte superiore) e delle piastrine, leucociti ed eritrociti (parte inferiore). Naturalmente la preparazione degli emocomponenti deve seguire gli stessi criteri di selezione del donatore e la stessa attenzione nella valutazione della compatibilità donatore – ricevente del sangue intero. Gli emocomponenti più utilizzati sono il concentrato di eritrociti e il plasma fresco congelato. Il loro utilizzo è piuttosto diffuso in medicina veterinaria, in quanto permettono un intervento terapeutico mirato e maggiormente efficace

grazie alla somministrazione della specifica componente deficitaria, riducendo i rischi di reazioni trasfusionali (dovute all'esposizione a componenti antigeniche ematiche non necessarie) o di sovraccarico circolatorio. Inoltre l'impiego dei prodotti trasfusionali permette l'ottimizzazione della donazione, in quanto da una singola unità donata vengono ricavati molteplici componenti, garantendo un efficiente sfruttamento delle risorse ematiche (Rozanski, 2004; Abrams – Ogg, 2012; Davidow, 2013; Agnoli, 2015).

Tuttavia ad oggi, per quanto riguarda la realtà della medicina trasfusionale veterinaria, la possibilità di utilizzo degli emocomponenti è limitata dalla normativa vigente e dalla scarsità di strutture autorizzate alla loro produzione. Gli emocomponenti infatti sono equiparati agli emoderivati e inseriti nella normativa riguardante il farmaco veterinario, attualmente sono disponibili solo per fini sperimentali in specifici centri autorizzati dal Ministero della Salute (Agnoli, 2015).

Sia il sangue intero che i suoi componenti possono essere impiegati “freschi” (immediatamente dopo il prelievo) o “conservati” (dopo conservazione). Nella pratica clinica veterinaria, soprattutto in piccole realtà, l'utilizzo dei prodotti freschi, con chiamata del donatore al momento del bisogno e trasfusione immediata del sangue prelevato, è ancora molto diffuso, nonostante il crescente interesse per i derivati ematici e la diffusione di banche del sangue da cui acquistarli già pronti. Bisogna infatti tenere conto che le emoteche permettono immediata disponibilità di sangue intero o derivati, ma molto spesso risultano esser molto costose e dispendiose per le strutture che solo occasionalmente necessitano di effettuare trasfusioni; una certa percentuale delle componenti conservate, se non impiegata, deve essere scartata a causa della limitata emivita. Al momento quindi l'istituzione di un'emoteca è prerogativa di strutture veterinarie di una certa dimensione dotate di un'unità di pronto soccorso e/o di un elevato numero di casi clinici che richiedono trasfusione. Inoltre, vi sono ancora numerose controversie sulla produzione e l'impiego dei prodotti conservati, ad esempio riguardo l'ideale durata della conservazione per minimizzare le “storage lesions” (danni alla vitalità e alla sopravvivenza dei globuli rossi conservati), o il metodo di somministrazione meno traumatico per ridurre il più possibile l'emolisi. Per questo motivo, negli anni passati, si è diffuso un crescente interesse nei confronti di tecniche trasfusionali meno convenzionali in grado di eludere i problemi legati alla conservazione, ad es. la trasfusione autologa o la xenotrasfusione. La trasfusione autologa o autotrasfusione consiste nel prelievo dalla cavità addominale o toracica del paziente di una certa quantità di sangue che viene filtrato e successivamente re-infuso allo stesso. E'una pratica piuttosto utile nella medicina d'urgenza e in tutti quei casi in cui non

c'è disponibilità immediata di sangue, inoltre azzerava completamente il rischio di reazioni post-trasfusionali. La trasfusione autologa è tuttavia sconsigliata nel caso in cui sia possibile la contaminazione del sangue con urine, batteri, bile, e naturalmente in presenza di neoplasie diffuse (Rozanski, 2004; McDevitt, 2011; Solomon, 2013; Kisielewicz, 2014).

Gli emoderivati sono prodotti proteici ematici derivanti dal frazionamento industriale del sangue mediante metodi biochimici (ad es. estrazione con etanolo), per produrre grandi quantità di plasma da più donatori. Questi prodotti comprendono: albumina, immunoglobuline per endovena e concentrati di fattori specifici. Il loro uso, se paragonato ai componenti ematici, è piuttosto limitato in medicina veterinaria, e molti prodotti utilizzati hanno origine dalla medicina umana. Recentemente sono stati introdotti sulla scena anche i succedanei del sangue, ovvero prodotti ottenuti con metodi biotecnologici: colloidali artificiali; trasportatori di ossigeno; sostituti piastrinici e proteine umane della coagulazione ottenute per mezzo del DNA ricombinante. (Abrams – Ogg, 2004).

1.41 EMOCOMPONENTI

Sangue intero fresco o FWB

Sangue prelevato e trasfuso entro 4-6 ore per mantenere inalterate tutte le componenti fisicamente presenti nel donatore: eritrociti; leucociti; piastrine; fattori della coagulazione tra cui il V, potenzialmente utile nel trattamento della DIC, l'VIII, essenziale per il trattamento dell'emofilia A, e il fWF; proteine plasmatiche incluse albumina antitrombina III; immunoglobuline. L'uso di sangue intero fresco è meno frequente rispetto ai prodotti conservati, in quanto lo screening per le malattie infettive e le prove di compatibilità richiedono fino a 24 ore per essere completate. Le principali indicazioni per il suo utilizzo sono: (1) anemia; (2) emorragie gravi e acute, con perdita superiore al 50% del volume ematico circolante, di origine traumatica, chirurgica, associata a disturbi dell'emostasi primaria (trombocitopenia /trombocitopenia ma solo in presenza di diatesi emorragica, in assenza di sintomi infatti la trasfusione di piastrine è sconsigliata per l'importante potere immunogeno a fronte di un'efficacia minima legata alla breve emivita) o secondaria (perdita e consumo di fattori della coagulazione, avvelenamento da rodenticidi.); (3) emofilia; (4) necessità di multiple componenti ematiche (ad esempio eritrociti, piastrine, fattori della coagulazione); (5) insufficienza epatica; (6) difetti della coagulazione come la DIC. (Lanevski, 2001; Chiaramonte, 2004; Abrams – Ogg, 2004; Wardrop, 2007;

Giger,2009; Lubas, 2011; Callan, 2012; Davidow, 2013; Kisielewicz, 2014; Abrams – Ogg, 2015; Agnoli,2015).

Sangue intero conservato o SWB

Sangue prelevato e conservato oltre 6 -8 ore dal prelievo, mantiene inalterata la componente eritrocitaria e le proteine plasmatiche (incluse albumina e ATIII), mentre si osserva progressiva riduzione – inattivazione funzionale di piastrine e leucociti all’aumentare del tempo di conservazione, e decadimento dei fattori labili della coagulazione (dopo 24 ore sono presenti solamente i fattori stabili II, VII IX e X). Dopo il prelievo le sacche vengono conservate a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in una frigo-emoteca che deve essere dotata di un registratore di temperatura con allarme acustico e collegata ad un gruppo di continuità: l’interruzione della refrigerazione per più di 30 minuti compromette la qualità del prodotto e ne comporta l’utilizzo entro 24 ore. Le sacche devono essere tenute in posizione orizzontale su un ripiano a griglia per consentire gli scambi gassosi con l’ambiente interno del frigo. Per migliorare l’ossigenazione del sangue conservato le sacche devono essere agitate almeno a giorni alterni, e questo permette anche di verificare eventuali variazioni di colore, presenza di coaguli ematici o alterazione dell’integrità della sacca (condizioni che comportano l’eliminazione dell’unità). Durante la conservazione del sangue si assiste ad un progressivo deterioramento delle caratteristiche del prodotto (“storage lesions”), che può incidere su efficacia e sicurezza della trasfusione; in particolare la conservazione determina graduale riduzione di 2,3 DPG eritrocitario e accumulo di metaboliti come l’ammoniaca, che vengono rapidamente rigenerati ed eliminati e in genere non inficiano sull’efficacia – sicurezza della trasfusione, tuttavia devono essere considerati con grande attenzione nei soggetti con grave insufficienza epatica. Studi hanno documentato che il deterioramento dei globuli rossi conservati inizia all’incirca entro qualche ora dalla messa in atto del processo di conservazione e si aggrava progressivamente ; il tempo massimo di conservazione varia in base alla soluzione anticoagulante-conservante utilizzata, secondo alcuni autori il sangue intero in CPDA1 è utilizzabile fino a 35 giorni (Giger, 2009; Lanevski, 2001) altri invece segnalano tempi di conservazione ottimali tra 21 e 28 giorni (Kisielewicz,2014; Davidow,2013; Hoenhaus,2012). In Italia il Gruppo Studio Trasfusioni GST VET ha fissato un limite massimo di 28 giorni per mantenere caratteristiche ottimali del prodotto (Lubas, 2015).

Per l’evidente presenza di questo deterioramento e del suo effetto potenzialmente negativo sull’effetto benefico della trasfusione, si ritiene opportuno somministrare sangue fresco o

conservato da poco tempo, idealmente da 14-21 giorni, specialmente nei soggetti in condizioni critiche (Kisielewicz, 2014).

Le indicazioni sono pressochè analoghe a quelle del sangue fresco, fatta eccezione per i disturbi coagulativi come Malattia di Von Willebrand o emofilia e trombocitopenia (a causa dell'inattivazione dei fattori labili della coagulazione e delle piastrine) o ad es. situazioni di concomitante anemia e ipoprotidemia (sanguinamenti gastrointestinali) (Callan, 2012; Lubas, 2015; Agnoli, 2015).

In linea generale la trasfusione del sangue intero ha due obiettivi principali: (1) ri-espansione del volume ematico nei soggetti che hanno perso in modo acuto una grande quantità del volume ematico circolante (anche il 50%) e richiedono diverse componenti ematiche; (2) ripristino dell'ossigenazione tissutale. Il sangue, sia fresco che conservato, non è il prodotto ideale nei soggetti in cui è richiesto specificamente il ripristino dell'ossigenazione tissutale senza particolare necessità di espansione del volume plasmatico, ad esempio nei casi di emorragia acuta con perdita di una quota inferiore al 50% del volume circolante, perdita ematica cronica, anemia emolitica o non rigenerativa; è preferibile ricorrere al concentrato di eritrociti insieme a soluzioni cristalloidi, in quanto la somministrazione di sangue intero può provocare ipervolemia (Lanevski, 2001).

Concentrato di eritrociti o Packed Red Blood Cells o PRBCs

Il concentrato di eritrociti è costituito dalla parte cellulare residua dopo la separazione dalla sacca madre della maggior parte del plasma (circa 80%): la sacca contenente sangue fresco viene centrifugata ad alta velocità, 4100-5000 rpm per 5-10 minuti oppure a 2700-3000 rpm per almeno 20 minuti in una centrifuga refrigerata a 4° - 8 °C, successivamente viene allontanato il plasma mediante estrattore meccanico. Vi sono due tipi di concentrato eritrocitario: (1) concentrato senza ulteriori soluzioni additive, conservato in modo e per un periodo di tempo analogo al sangue intero; (2) concentrato con aggiunta, entro 72 ore dalla raccolta, di soluzioni additive (Adsol®, Nutricel®, Optisol®, SAG-Mannitolo) che ne aumentano la conservabilità anche sino a 40 – 42 giorni circa. In realtà la revisione della letteratura veterinaria segnala che dopo 14 giorni si ha un progressivo deterioramento della qualità e delle caratteristiche dei RBC, riducibile mediante il ricorso alla leucodeplezione; in ogni caso è necessario che, soprattutto in pazienti critici, si utilizzi PRBC conservato per il minor tempo possibile. L'impiego del concentrato eritrocitario è indicato principalmente per la correzione - prevenzione di uno stato di ipossia tissutale nei pazienti anemici ma normovolemici che non richiedono fattori della coagulazione e sono soggetti a patologie

cardiache o renali in cui evitare il sovraccarico volemico; sostanzialmente nel trattamento di anemia sintomatica da emolisi o inefficace eritropoiesi. Il PRBCs può essere utilizzato anche per il trattamento di anemie emorragiche acute in associazione con prodotti plasmatici, soluzioni colloidali sintetiche e cristalloidi, qualora non sia disponibile il sangue intero. L'impiego del PRBC non è invece indicato in caso di piastrinopenie e turbe coagulative (Lanevski, 2001; Abrams – Ogg, 2004; Chiaramonte, 2004; Wardrop, 2007; Lubas, 2011; Davidow, 2013; Kisielewicz, 2014; Hann, 2014; Agnoli, 2015).

Il PRBC sottoposto a leucodeplezione è particolarmente indicato nei pazienti politrasfusi, critici, settici o con gravi patologie metaboliche, emolitiche o neoplastiche (BrownLee, 2000).

L'indicazione più comune per la trasfusione di globuli rossi nel cane (sangue intero fresco o conservato e globuli rossi concentrati) è rappresentata dall'anemia; altre indicazioni minori sono l'apporto di ferro (1 ml di emazie concentrate apporta circa 1 mg di ferro) e l'amplificazione dell'emostasi primaria, favorita dal miglioramento dell'adesione tra le piastrine e l'endotelio e dal rilascio di ADP (Callan, 2012; Giger, 2015; Agnoli, 2015).

Nell'anemia lo scopo principale dei globuli rossi è correggere – prevenire uno stato di ipossia tissutale, aumentando rapidamente l'apporto di ossigeno ai tessuti in condizioni di ridotta concentrazione di emoglobina, ridotto valore ematocrito, ridotta capacità ossiforetica, e in presenza di meccanismi fisiologici compensatori inadeguati. In questo contesto, il parametro decisionale (transfusion trigger) su cui basarsi per stabilire la necessità o meno della trasfusione di sangue dovrebbe teoricamente essere rappresentato dalla misurazione della pressione parziale dell'ossigeno (PO_2) intracellulare; in ambito clinico tuttavia si ricorre maggiormente ad altri indicatori come concentrazione di emoglobina ([Hgb]), valore ematocrito (Hct) e numero di globuli rossi (Hayden, 2012; Agnoli, 2015).

In particolare la letteratura trasfusionale umana si riferisce principalmente alla concentrazione di emoglobina, mentre in medicina veterinaria è più usuale parlare di valore ematocrito, anche se i due parametri sono ovviamente interconnessi: empiricamente in presenza di globuli rossi con contenuto emoglobinico nell'intervallo di normalità, il valore ematocrito espresso in percentuale si può ottenere dalla concentrazione di emoglobina moltiplicata per tre (Tvedten, 2012; Agnoli, 2015).

Dalle numerose sperimentazioni cliniche e dagli studi di meta-analisi condotti nell'ultimo decennio, è emersa la limitatezza dell'utilizzo di Hct e [Hgb] quali singoli indicatori delle necessità trasfusionali del paziente (Callan, 2012; Holst, 2015; Agnoli, 2015).

Questo evidenzia la necessità di una valutazione complessiva e dinamica del paziente su cui si vorrebbe eseguire una trasfusione (Prittie,2010; Callan, 2012; Agnoli,2015).

Il trattamento trasfusionale con globuli rossi in corso di IMHA è stato molto dibattuto: in genere si consiglia di effettuare trattamenti trasfusionali coerenti con le necessità individuali del soggetto, valutate attraverso parametri clinici e clinico-patologici, idealmente dopo aver già improntato un'adeguata terapia immunosoppressiva (Giger, 2015; Agnoli,2015).

Inoltre un recente studio ha evidenziato come i globuli rossi più vecchi siano meno benefici e soprattutto meno sicuri rispetto a quelli freschi (Meybohm,2015; Agnoli,2015).

La trasfusione di globuli rossi stoccati per periodi prolungati, in medicina umana, sembra infatti essere associata a: maggiore emolisi; aumento del danno ossidativo; amplificazione della secrezione di citochine, dell'attivazione endoteliale e del rischio trombotico nel ricevente (Hod, 2010; Liona, 2010; Donadee, 2011; Agnoli, 2015).

Plasma Fresco Congelato o Fresh Frozen Plasma o FFP

Prodotto trasfusionale ricavato mediante separazione dal PRBCs in una centrifuga refrigerata a 4° - 6°C entro 6 ore dal prelievo, congelato immediatamente a – 20 °C e conservato per un anno (Lanevski, 2001; Chiaramonte, 2004; Wardrop,2007; Giger,2009; Lubas, 2011; Davidow,2013; Giger, 2015; Agnoli, 2015).

In realtà un recente lavoro ha dimostrato che il plasma canino può essere conservato refrigerato fino a 14 giorni, senza una rilevante perdita dei fattori della coagulazione (Grochowsky,2014).

La letteratura veterinaria più recente segnala inoltre che i tempi di separazione e di congelamento entro le 24 ore non influenzano le caratteristiche del FFP o del FP (Walton,2014).

Il plasma fresco congelato mantiene inalterati: (1) tutti i fattori della coagulazione, labili (V e VIII), stabili (II, VII, IX, X,XI, XII, Fibrinogeno, ATIII) e di Von Willebrand (vWF) ; (2) complemento; (3) proteine plasmatiche tra cui anticoagulanti (antitrombina, proteina C e proteina S); (4) proteine fibrinolitiche (plasminogeno e sue proteine regolatrici); (5) immunoglobuline. Il controllo di qualità sui fattori della coagulazione è possibile misurando l'attività del Fattore VIII, che deve essere almeno il 60% della quantità originale iniziale. Il plasma fresco congelato contiene quindi numerose proteine coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, ma generalmente è somministrato in virtù del suo apporto di proteine plasmatiche, albumina e immunoglobuline. Le applicazioni

cliniche in medicina veterinaria, anche se descritte nei libri di testo, mancano di robuste evidenze scientifiche. I principali campi di utilizzo sono: (1) profilassi dei sanguinamenti in pazienti con predisposizione o tendenza al sanguinamento a causa di gravi carenze di uno o più fattori (compreso il fibrinogeno) qualora sia necessaria una procedura invasiva (ad es. biopsia epatica in un cane affetto da insufficienza epatica con allungamento dei tempi di coagulazione e riduzione del fibrinogeno); (2) terapia dei sanguinamenti in caso di carenze congenite di uno o più fattori della coagulazione o patologie acquisite (mancata produzione, aumentato consumo). In sostanza il plasma rappresenta il prodotto trasfusionale di prima scelta in pazienti con coagulopatie congenite (Malattia di Von Willebrand, emofilia A -B) o acquisite (ad esempio insufficienza epatica).

Possono essere considerate indicazioni di utilizzo: (1) avvelenamento da rodenticidi, tuttavia la somministrazione di vitamina K da sola regolarizza i tempi della coagulazione entro 4 ore (Senzolo,2014) ;(2) stato infiammatorio sistemico /DIC, l'impiego è controverso, dovrebbe essere riservato ai pazienti con sanguinamento in atto (es. DIC scompensata) anche se la somministrazione di plasma non sembra utile per aumentare la concentrazione dell'antitrombina (Snow, 2010) ; (3) grave pancreatite acuta necrotizzante, per ripristinare adeguati livelli di α - macroglobuline e albumina, l'effetto non è stato scientificamente dimostrato (Weatherton,2009); (4) parvovirosi; (5) sepsi; (6) endotossiemia; (7) espansione del volume plasmatico o reintegrazione di una perdita ematica massiva entro poche ore (Lanevski, 2001; Chiaramonte, 2004 ; Wardrop,2007; Giger,2009;Lubas, 2011; Davidow,2013; Giger, 2015;Agnoli, 2015).

In realtà l'impiego del plasma fresco congelato in medicina veterinaria in corso di queste condizioni è stato spesso discusso e associato ad un potenziale beneficio, tuttavia non vi è ancora una forte evidenza scientifica che ne supporti la somministrazione o che ne documenti l'efficacia nel prevenire una condizione di ipocoagulabilità e una prognosi peggiore (Brooks, 2012; Santoro, 2015; Agnoli,2015).

Nello specifico il trattamento della parvovirosi prevede la somministrazione di PRBC per il trattamento dell'anemia legata alla diarrea emorragica (ed anche ad eventuali parassiti concomitanti), in associazione a FFP, per correggere l'ipoalbuminemia e soprattutto in quanto fonte di Ig e inibitori delle proteasi sieriche, per cui contribuisce alla neutralizzazione del virus circolante e alla riduzione dell'infiammazione sistemica (Prittie, 2004;).In realtà in uno studio non è stato osservato un possibile beneficio (Bragg,2012).

Il plasma può essere impiegato come risorsa iniziale d'emergenza nei casi di perdita proteica acuta, ad esempio nei soggetti ustionati, ma non è indicato come fonte proteica a

lungo termine per i soggetti sottoposti a continua perdita proteica e ipoalbuminemia da affezioni proteino-disperdenti (enteropatie, nefropatie, vasculopatie o dermatiti essudative) o inadeguato assorbimento; si preferisce ricorrere alla nutrizione enterale o parenterale. E' stato dimostrato che il plasma non è utile per correggere lo squilibrio della pressione oncotica dovuto all'ipoalbuminemia, in quanto una volta trasfusa circa il 60% dell'albumina ritorna nell'interstizio, pertanto sono necessari almeno 45 ml/kg per aumentare di 1 g/dl l'albumina plasmatica e mantenerla tale (soprattutto se la causa è una vasculite che spinge l'albumina nell'interstizio): ciò diventa costoso nei soggetti di grossa taglia e aumenta il rischio di reazioni trasfusionali. Si ritiene più utile ricorrere ai colloidi e agenti iperoncotici sintetici come il destran -70 o l'Hetastarch®. Animali in condizioni critiche con concentrazione di albumina inferiore a 1,5 g/dl possono beneficiare del trattamento con plasma in quanto l'albumina è importante trasportatore di farmaci, ormoni, ioni, enzimi, metalli e anche tossine (Giger, 2009; Snow, 2010; Craft, 2012; Odunayo, 2011; Lubas, 2011; Brooks, 2012; Lubas, 2015; Giger, 2015; Agnoli, 2015).

Dopo un anno di conservazione il Plasma Fresco Congelato viene ri-classificato come Plasma Congelato o Frozen Plasma, che può essere conservato a -20°C per altri 4 anni (Lanevski, 2001; Chiaramonte, 2004; Wardrop, 2007; Lubas, 2011; Davidow, 2013; Kisielewicz, 2014).

Plasma Congelato o Frozen Plasma o FP

Prodotto trasfusionale ottenuto da: (1) plasma separato dai globuli rossi e congelato dopo 24 ore dalla raccolta; (2) FFP decongelato e ricongelato; (3) FFP congelato da più di un anno (dopo la sua scadenza), fino ad un massimo di circa 5 anni. Questa unità presenta ancora una residua attività dei fattori della coagulazione, in particolare i fattori vitamina K – dipendenti (II, VII, IX, X), per questo rappresenta una scelta di trattamento delle coagulopatie II ad avvelenamento da rodenticidi, ma viene principalmente impiegato come fonte di albumina. In realtà uno studio recente, basato su rilievi tromboelastografici, ha dimostrato che nonostante l'attività notevolmente inferiore dei fattori VIII e X nel plasma congelato dopo 5 anni di conservazione (rispetto al FFP), il prodotto mantiene una certa attività emostatica terapeutica. Inoltre è stato osservato che l'attività dell'AT del FP è biologicamente equivalente a quella dell'FFP, e questo è un dato rilevante in quanto tradizionalmente solo l'FFP viene impiegato nel cane come fonte di AT (Urban, 2013; Kisielewicz, 2014).

Pertanto allo stato attuale il Gruppo di Studio Trasfusioni Veterinarie ritiene che si possa fare riferimento alla sola definizione di plasma congelato o FP.

Può essere ricavato anche da un'unità di sangue intero alla scadenza, in questo caso è utile esclusivamente come fonte di albumina. (Chiaramonte, 2004; Wardrop, 2007; Lubas, 2011; Davidow, 2013; Lubas, 2015).

In corso di particolari patologie immunomediate il FP viene impiegato anche nella plasmaferesi (TPE), che prevede la sostituzione del plasma del paziente.

Studi recenti hanno dimostrato che il FP può essere scongelato e conservato refrigerato fino a 5 giorni o ricongelato entro 1 ora (se mantenuto a 4°C) senza perdita di efficacia (Yaxley, 2010).

Crioprecipitato

Preparato trasfusionale ricavato dall'unità di FFP scongelato in modo prolungato a 4°C e centrifugato a circa 1000 rpm per 15 minuti per separare il materiale bianco gelatinoso precipitato. Il sovranatante viene estratto; il sedimento residuo nella sacca scongelata, il crioprecipitato che contiene proteine insolubili a freddo, viene trasferito in una sacca satellite, successivamente ri-congelato a - 20°C e conservato fino a un anno dalla data del prelievo. Il crioprecipitato, in una ridotta quantità di plasma (circa 20 ml) è ricco di: fattori VIII, IX, XIII, vWF e fibrinogeno; α_2 macroglobulina ; Fibronectina. Per questo motivo è il prodotto veterinario di scelta per il trattamento di coagulopatie congenite come la Malattia di Von Willebrand, l'Emofilia A o l'ipo / disfibrinogenemia; il vantaggio principale nel suo impiego consiste nel ripristino di uno o più fattori della coagulazione mediante ridotto volume di plasma. E' stata dimostrata la sua efficacia superiore rispetto al FFP nel trattamento di coagulopatie congenite come la Malattia di Von Willebrand, in quanto 1 unità di crioprecipitato (37 ml contro 220 del FFP) presenta una concentrazione nettamente superiore di vWf e FVIII (40-60%), inoltre non comporta reazioni a piastrine, leucociti, proteine plasmatiche e citochine (Stokol, 1998 ; Lanevski, 2001 ; Chiaramonte, 2004 ; Abrams – Ogg , 2004 ; Wardrop, 2007 ; Lubas, 2011 ; Davidow, 2013 ; Chambers, 2013; Lubas, 2015 ; Agnoli, 2015)

Plasma privo del Crioprecipitato o CPP

Sovranatante o plasma residuo della preparazione del crioprecipitato che viene conservato a - 20°C per un massimo di 5 anni. Contiene i fattori della coagulazione vitamina K dipendenti, albumina e ATIII; per questo viene impiegato frequentemente nel trattamento

di avvelenamento da rodenticidi, emofilia B, ipoalbuminemia e DIC (Abrams – oggi, 2004; Lubas, 2011; Davidow,2013).

Plasma Ricco di Piastrine

Prodotto trasfusionale impiegato nella sola specie canina e preparato, entro 6 ore dal prelievo, mediante centrifugazione della sacca madre di sangue intero a velocità più bassa (1000 g per 4-6 minuti o 2000-2500 g per 2,5-3 minuti) rispetto a quella utilizzata per separare PRBC e plasma. Tale procedura consente di concentrare le piastrine nel plasma, che verrà trasferito in una sacca satellite. L'utilizzo del plasma ricco di piastrine è occasionalmente indicato nella pratica veterinaria, vi sono infatti tre principali limitazioni: (1) difficoltà nell'ottenere un volume adeguatamente terapeutico; (2) breve durata delle piastrine e conseguente necessità di utilizzare il prodotto subito dopo il prelievo; (3) rischio di allo-immunizzazione a seguito della prima trasfusione. Si consiglia di evitare la sua somministrazione in presenza di trombocitopenia immunomediata perché le piastrine trasfuse vengono rapidamente distrutte; sono quindi necessarie numerose unità e soprattutto vi è un alto rischio di produzione di allo - anticorpi (Lanevski, 2001; Abrams- Oggi, 2004; Lubas, 2011).

Concentrato di Piastrine

Prodotto ricavato per aferesi o centrifugazione (a 2000 g per 4-6 minuti o a 4000-5000 g per 3 minuti) del plasma ricco in piastrine e lasciato a riposo per 60 minuti, in modo da promuovere la disaggregazione delle piastrine, successivamente ri-sospese tramite massaggio della sacca. Può essere conservato a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in agitazione continua per un periodo di tempo non superiore a 5 giorni dal prelievo.

I prodotti piastrinici in generale sono indicati per il trattamento di emorragie da trombocitopenia-trombocitopatia (Abrams – Oggi, 2004; Wardrop,2007; Lubas, 2011)

<i>Prodotto</i>	<i>Stoccaggio</i>	<i>Indicazioni</i>
Sangue fresco intero	< 8 ore - T° ambiente	Anemia associata ad alterazioni emostatiche I e II
Sangue fresco intero	< 24 ore – refrigerazione a 4°C	Anemia associata ad alterazioni dell'emostasi II
Sangue intero conservato	28 giorni – refrigerazione a 4°C	Anemia e contestuale ipoprotidemia

Globuli rossi concentrati	Variabile a seconda di soluzioni nutrienti (comunque < 35 giorni) – refrigerazione 4°C	Anemia
Plasma ricco di piastrine/concentrati piastrinici	1 – 5 giorni (costantemente mantenuti in movimento) - T° ambiente	Trombocitopenia associata a severe diatesi emorragiche
Plasma fresco congelato	1 anno – congelamento -20°/ - 40°C	Carenze dei fattori della coagulazione, alterazione dell'omeostasi II, ipoproteinemia
Plasma fresco conservato	>1 anno e < 5 anni – congelamento -20°/ - 40°C	Ipoprotidemia
Crioprecipitato	1 anno – congelamento -20°/ - 40°C	Malattia di von Willebrand, emofilia A, ipoprotidemia
Criosurnatante	1 anno – congelamento -20°/ - 40°C	Ipoprotidemia, coagulopatie II alla carenza di fattore II, VII, IX, XI

Tabella 1.41 - Modalità di stoccaggio e principali indicazioni dei prodotti trasfusionali (Agnoli, 2015)

1.5 SOMMINISTRAZIONE DELLA TRASFUSIONE e MONITORAGGIO DEL PAZIENTE

Per terapia trasfusionale si intende la sicura ed efficace somministrazione di sangue come supporto terapeutico, a pazienti anemici o in preda ad emorragie; la trasfusione infatti ha lo scopo di reintegrare le componenti ematiche perse e aumentare la capacità di trasporto dell'ossigeno ai tessuti nei casi di anemia, emorragia, emolisi o inefficace eritropoiesi. Tuttavia è importante sottolineare che l'intervento trasfusionale non rappresenta quasi mai il trattamento definitivo di una patologia, ma serve solo come trattamento di supporto per correggere le alterazioni ematologiche ed emodinamiche del paziente, in attesa della diagnosi e degli effetti della terapia eziologica (Giger, 2009; Kisielewicz, 2014; Lubas, 2015).

La decisione di trasfondere o meno un paziente prevede una completa valutazione della storia clinica del cane, dei reperti di laboratorio e soprattutto delle condizioni cliniche del soggetto, in base alla velocità di insorgenza dell'anemia e alla capacità del suo organismo di tollerare questa condizione; una trasfusione infatti può comportare delle complicazioni, richiede un'attenta valutazione del rapporto rischi /benefici, e soprattutto di tutte le possibili alternative terapeutiche.

In genere i principali parametri che vengono presi in considerazione per valutare se e quando effettuare una trasfusione (transfusion trigger) sono : (1) colore delle mucose apparenti; (2) TRC ; (3) FC –FR; (4) pressione sanguigna; (5) valore dei lattati ; (6) volemia del soggetto; (7) presenza di meccanismi compensatori quali > gittata, >flusso arterioso coronarico, re-distribuzione del flusso ematico, > 2,3 DPG eritrocitario e conseguente aumento dell'estrazione tissutale di ossigeno; (8) integrità del sistema cardiocircolatorio; (9) presenza di patologie pregresse a carico di organi particolarmente sensibili al danno ipossico (ad es. rene, cervello, cuore); (10) necessità anestesilogiche e chirurgiche. In realtà ancora oggi non vi è consenso in letteratura circa i trigger trasfusionali più adeguati e la sicurezza effettiva dell'intervento. Indicazioni generali per la decisione trasfusionale :

(1) Hct < 12%, trasfusione quasi sempre indicata per la presenza di un deficit nell'ossigenazione dei tessuti (fatto salvo la valutazione clinica di patologie intercorrenti che ne possono sconsigliare la somministrazione); (2) Hct < 20%, trasfusione indicata in base alla clinica e alla velocità di insorgenza dell'anemia, in caso di ipovolemie e perdite di sangue acute /iperacute può essere consigliata anche con valori Hct > 20% ; (3) prima di un intervento chirurgico è preferibile che l' Hct sia > 25%,per mantenere un' adeguata capacità di trasporto dell'ossigeno durante l'anestesia; (4) presenza di segni clinici indicativi quali tachicardia, allungamento del refill time, tachipnea, mucose pallide – cianotiche, polso filiforme, letargia e collasso. Soggetti che presentano una perdita emorragica acuta superiore al 20% del volume ematico, in corso di anemia emorragica acuta, richiedono la prevenzione - correzione dello shock ipovolemico e il ripristino della normale volemia, per assicurare l'ossigenazione tissutale, mediante una trasfusione in aggiunta ad un'iniziale somministrazione di fluidi per impedire lo shock. Nei casi di perdita iperacuta è importante ricordare che il valore Hct del paziente rimane stabile, se non addirittura aumentato, per qualche ora dall'evento emorragico a causa della perdita di globuli rossi e della componente plasmatica; solo in seguito si stabilizza sul valore effettivo per effetto della ridistribuzione dei fluidi interstiziali. In questa condizione diventano quindi estremamente importanti altri indicatori clinici e clinico-patologici, rispetto al valore Hct, del paziente su cui fare affidamento. (Giger, 2009; Lubas, 2015; Agnoli, 2015).

La frequenza respiratoria o l'emogasanalisi arterioso possono essere utili nel valutare pazienti con patologie respiratorie concomitanti che potrebbero incidere sull'ossigenazione complessiva; una valutazione elettrocardiografica può svelare la presenza di un insulto ipossico cardiaco sublinico (Santoro,2015; Agnoli,2015).

Cani affetti da forme croniche di anemia possono non richiedere trattamenti trasfusionali sino a valori di ematocrito molto bassi (10-12%), grazie allo sviluppo di meccanismi compensatori come l'aumento della ventilazione, l'aumento della quota di O₂ cedibile ai tessuti grazie all'aumentata produzione di 2,3 DPG, il progressivo aumento della gittata e della volemia (Callan,2012; Agnoli,2015).

La scelta del prodotto trasfusionale adeguato e il calcolo della quantità da somministrare devono essere rigorosamente effettuati caso per caso: al ricevente dovrebbe essere somministrato solo il componente ematico necessario, secondo le modalità, i dosaggi e la velocità di infusione più adeguati (Lanevski,2001; Agnoli, 2015).

Subito prima della trasfusione il ricevente deve essere pesato, sottoposto ad esame clinico completo e ad un prelievo di sangue per determinare il valore ematocrito attuale; l'animale viene poi trasferito in una stanza tranquilla con possibilità di continuo monitoraggio clinico. Le trasfusioni possono essere effettuate anche in sede intraoperatoria su pazienti anestetizzati, ma in questo caso risulta difficile rilevare eventuali reazioni trasfusionali (Lubas, 2015).

Prima della somministrazione i prodotti trasfusionali devono essere portati a temperatura ambiente o corporea (massimo 37°C poiché altrimenti possono verificarsi emolisi e coaguli da eccessivo riscaldamento), in quanto l'infusione di fluidi freddi può indurre nel ricevente ipotermia e aritmie. In realtà nella consueta pratica trasfusionale, non è necessario riscaldare il sangue o il PRBC refrigerati, anche perché il riscaldamento accelera il deterioramento dei globuli rossi conservati e favorisce la proliferazione di eventuali germi contaminanti ; inoltre l'ampia superficie di contatto del deflussore può consentire al sangue di raggiungere naturalmente una temperatura simile a quella ambientale, soprattutto in condizioni di flusso lento (Davidow, 2013 ; Prittie, 2013 ; Kisielewicz, 2014 ; Agnoli, 2015).

Vi sono tuttavia diverse e specifiche condizioni cliniche in cui il riscaldamento è necessario per evitare effetti collaterali, ad esempio la trasfusione in soggetti neonati o ipotermici, la rianimazione di pazienti traumatici, o la somministrazione rapida e massiva di prodotti ematici (Giger, 2009; Agnoli,2015).

Il riscaldamento può essere realizzato in vari modi : immersione della sacca capovolta a bagnomaria, mai direttamente ma sempre all'interno di un sacchetto di plastica sigillato (la sacca è infatti porosa e il sangue si altera al contatto con l'acqua) ; utilizzo di appositi macchinari elettrici o forno a microonde a temperatura controllata $\leq 37^{\circ}\text{C}$, per scongelare prodotti congelati; impiego di riscaldatori elettrici durante la fase di somministrazione o

più facilmente riscaldamento del deflussore in una bacinella di acqua riscaldata a 37° - 38°C (metodo più sicuro e meno invasivo) (Callan, 2012 ; Agnoli,2015).

Bagnomaria e incubatori rappresentano le principali modalità di riscaldamento dei prodotti sia plasmatici che eritrocitari, in entrambi i casi è fondamentale il controllo della temperatura: un eccessivo riscaldamento infatti può determinare emolisi o proteolisi riducendo l'efficacia del prodotto e aumentando i rischi ad esso associati (Abram-Oggs,2004; Brooks, 2012; Agnoli,2015).



Figura 1.5- Riscaldamento del sangue intero e di FFP a bagnomaria (Prof.ssa Daniela Proverbio, Università degli studi di Milano)

Prima della somministrazione è importante anche ispezionare attentamente la sacca per valutarne le condizioni: si deve sospettare una contaminazione batterica in presenza di alterazioni di colore di parti della sacca, colorazione violacea delle masse di globuli rossi con sopra un'area di emolisi, presenza di coaguli, colorazione variabile dal rossiccio al marrone scuro del plasma o del fluido sopranatante. In presenza di questi elementi è consigliabile eseguire un'emocoltura per confermare/ sfatare il sospetto di contaminazione. Le unità aperte e parzialmente utilizzate devono essere impiegate nel minor tempo possibile, e comunque entro le 24 ore per ridurre il rischio di contaminazione e proliferazione batterica, altrimenti devono essere eliminate. Prima della trasfusione il sangue intero conservato va agitato capovolgendo la sacca dolcemente (almeno 60 volte), il PRBC invece va diluito con 100 mL di soluzione fisiologica a 37°C e massaggiato delicatamente in modo da ri-sospendere i globuli rossi (altrimenti risulta essere troppo viscoso e c'è la possibilità che si formino aggregati, in quanto il PCV ha un valore pari 70 -80%, soprattutto se sono state aggiunte sostanze nutritive). Una volta raggiunta la temperatura adeguata, la sacca viene collegata ad un deflussore specifico per trasfusioni, provvisto di doppia camera con

filtro a pori del diametro di 170 – 260 μm che serve a trattenere coaguli, aggregati piastrinici e lipidi in grado di provocare tromboembolismi; è necessario che tale deflussore sia “latex-free” per la somministrazione di prodotti piastrinici, in modo da evitare la aggregazione. I filtri andrebbero rimossi e sostituiti ogni 4 – 6 ore, al fine di ridurre il rischio di contaminazione batterica.



Figura 1.51- Deflussore specifico per la trasfusione (Prof.ssa Daniela Proverbio, Università degli studi di Milano)

E'importante ricordare che la linea infusionale utilizzata per la trasfusione non deve essere sfruttata per la somministrazione di alcun farmaco o fluidi, fatta eccezione per la soluzione NaCl 0,9%, aggiunta nel caso in cui la sacca contenga poco plasma per fluidificare; evitare il Ringer Lattato perché contiene Ca che può innescare la coagulazione, e anche il destrosio perché, in quanto ipertonico, può portare aggregazione, rigonfiamento e lisi dei globuli rossi. L'infusione avviene per via endovenosa tramite la cefalica, safena o giugulare (o qualsiasi altra vena accessibile), anche se nei soggetti di piccola taglia e /o con vene scarsamente /non accessibili può essere sfruttata la via intraossea ad assorbimento rapidissimo (cresta iliaca, tubercolo maggiore dell'omero, fossa trocanterica o cresta tibiale nei soggetti neonati). La via intraperitoneale non è raccomandata nel caso della trasfusione, se non nei soggetti neonati, poiché l'assorbimento è rallentato (24-72 h) e l'emivita delle cellule è ridotta.(Abrams – Ogg, 2004; Wardrop, 2007; Giger, 2009; McDevitt,2011; Callan, 2012; Carli, 2013; Mackin, 2013 ; Kisielewicz, 2014; Lubas, 2011; Lubas, 2015; Agnoli, 2015; Wardrop, 2016).

E' necessario impiegare un catetere intravenoso adeguato e di dimensioni compatibili alla taglia del paziente, per ridurre l'emolisi eritrocitaria in corso di infusione. La somministrazione del sangue può avvenire semplicemente per gravità o mediante l'utilizzo

di pompe /siringhe ad infusione, anche se studi hanno dimostrato una ridotta sopravvivenza dei globuli rossi somministrati mediante pompa /siringa rispetto alla gravità per insorgenza di emolisi. Vi sono tuttavia alcuni casi in cui questi dispositivi sono indispensabili, ad esempio soggetti molto piccoli /neonati, ed è riportato in letteratura che raramente contribuiscono a reazioni avverse o effetti collaterali (McDevitt, 2011; Carli, 2013; Lubas, 2015).



Figura 1.53 -Trasfusione per gravità (Lubas,2015)



Figura 1.54 -Trasfusione mediante pompa ad infusione (www.petsblog.it)

Eventualmente, prima della conservazione o della trasfusione, può essere applicata la leucodeplezione, una procedura di filtrazione dei globuli bianchi e delle piastrine presenti nel sangue intero da somministrare, mediante apposito filtro. E' stato dimostrato sperimentalmente che la leucodeplezione comporta miglior conservazione dei globuli rossi, riduzione della liberazione di citochine (che contribuiscono alle storage lesions) e una minor frequenza di reazioni trasfusionali non emolitiche. Si riducono infatti la concentrazione dei fattori di crescita (ad es. VEGF) e delle sostanze bioattive rilasciati nel sangue conservato (come ad es. istamina, mieloperossidasi e plasminogeno), e lo stato infiammatorio indotto nel ricevente dalla trasfusione, con ridotto rialzo di leucociti, fibrinogeno e proteina C reattiva (Graf, 2012 ; Davidow, 2013 ; Kisielewicz, 2014; Lubas, 2015).

La leucodeplezione più efficace e maggiormente utilizzata è la “pre-storage”, ovvero effettuata sulla sacca di sangue intero prima della suddivisione in emocomponenti proprio per impedir l’accumulo di metaboliti derivanti dalla degradazione dei WBC e la formazione di microaggregati e frammenti leucocitari (Seghatchian,2002).

La procedura deve essere eseguita 2-3 ore dal prelievo di sangue intero mantenuto a temperatura ambiente (20 °C); prevede l'impiego di sacche quaduple munite di appositi filtri meccanici che contengono membrane di materiale sintetico (poliuretano o poliestere) dotate di pori a cui aderiscono WBC e PLT. Alla sacca madre utilizzata per il prelievo del sangue intero sono raccordate altre 3 sacche satelliti: nella prima, attraverso un deflussore dotato di filtro per leucodeplezione viene fatto defluire per gravità il sangue intero, ottenendo così sangue intero leucodepleto che può essere centrifugato per ottenere la separazione tra plasma e PRBC leucodepleti. Per verificare l'esito del processo si va ad analizzare il sangue intero che resta nel collettore posto tra il filtro e la seconda sacca: il PRBC leucodepleto contiene circa il 90% in meno di WBC e PLT rispetto al prodotto di origine.

E'importante sottolineare che, comunque, la leucoriduzione non elimina tutte le possibili risposte infiammatorie scatenate dal sangue conservato: il sangue stoccato da oltre 28 giorni, a prescindere dalla leucoriduzione, induce una risposta infiammatoria nel ricevente sano con aumento di neutrofili e della concentrazione di MCP-1, riduzione delle piastrine e segni di emolisi extravascolare (Callan, 2013; Kisielewicz, 2014).



Figura 1.55- Leucoriduzione e ingradimento del filtro (Prof.ssa Daniela Proverbio, Università degli studi di Milano)

La velocità di somministrazione del sangue trasfuso dipende da stato cardio –circolatorio, stato di idratazione, grado di anemia e condizioni generali del ricevente. Come regola generale è stata fissata una velocità iniziale di 0,5 – 1 ml/Kg/h durante i primi 30 minuti per monitorare il paziente e permettere il rilievo precoce di eventuali reazioni avverse, in assenza di problemi è possibile aumentare la velocità sino a 5-10 ml/kg/h. Nei soggetti con

rischio di sovraccarico del circolo la velocità di somministrazione non deve superare mai i 3 – 4 ml/kg/h. La somministrazione dovrebbe completarsi in 4 ore per ridurre il rischio di contaminazione batterica. La velocità massima di trasfusione è di 22 ml/Kg/h nei casi di emergenza, si consiglia monitoraggio cardiologico (specie se somministrati elevati volumi) perché possono insorgere aritmie; spesso il vomito rappresenta un segno precoce di eccessiva velocità di flusso (Giger,2009; Lubas,2011; Carli,2013; Mackin,2013; Kisielewicz, 2014).

I volumi vengono calcolati mediante apposite formule in relazione al prodotto trasfusionale da somministrare:

Sangue intero

$$(1) \text{ Volume da trasfondere (ml)} = K \times \text{peso ricevente (Kg)} \times [\text{Hct desiderato} - \text{Hct ricevente} / \text{Hct donatore}]$$

$$K = \text{volume ematico cane} = 85 - 90 \text{ ml/kg}$$

$$(2) \text{ Volume da trasfondere (ml)} = \% \text{ di incremento del Hct desiderata} \times 1,5 \times \text{Kg peso}$$

In generale si può considerare che 2 ml di sangue trasfuso su kg di peso corporeo del ricevente innalzano il valore Hct del 1% (anche se con una forte influenza della situazione clinica del ricevente); nella pratica in genere si trasfonde un volume ematico di 10 – 22 ml/kg/die (da non oltrepassare se non in casi di grave perdita), massimo 5 ml/kg/die nei soggetti cardiopatici. In corso di shock emorragico è consigliabile somministrare, nel corso di 10 minuti, 4-5 ml/Kg EV di soluzione salina ipertonica (7,5%) e, una volta sotto controllo il sanguinamento, reintegrare il rimanente deficit con sangue intero. L'Hct desiderato dipende dalla causa sottostante: nei pazienti ipovolemici di solito si vuole raggiungere un Hct 25 – 30%, in caso di anemia immuno-mediata è sufficiente un 20-25%, in modo da ottenere la stabilizzazione del sistema cardiocircolatorio senza soppressione della produzione midollare (Abrams –Ogg, 2004; Lubas, 2011 ; Carli, 2013 ; Davidow, 2013 ; Kisielewicz, 2014 ; Lubas, 2015).

PRBC

$$\text{Volume da somministrare (ml)} = [\text{peso ricevente (kg)} \times 90/67] \times [\text{Hct finale} - \text{Hct ricevente}] / \text{Hct unità}$$

In linea generale si considera che 1,5 mL di PRBC trasfuso /Kg peso ricevente aumenta del 1% l'Hct del ricevente, come regola pratica si consiglia la somministrazione di 6-10 ml/Kg/die

Velocità di trasfusione = 2-4 ml/kg/h

(Abrams –Ogg, 2004; Lubas, 2011; Carli, 2013; Davidow, 2013; Lubas, 2015).

Plasma

Volume di plasma da trasfondere (mL) = Peso del ricevente (kg) x K x [livello albumina plasmatica (g/L) desiderato – livello albumina plasmatica (g/L) presente nel ricevente]

K = volume di plasma canino = 4,5 % (stima)

In linea generale si somministra una dose pari a 6-10 ml/kg /12-18 h fino a 20 ml/kg per gravi coagulopatie, 1 unità di FFP ogni 10-20kg peso e 45ml/kg nei casi di ipoalbuminemia (aumento albumina 1g/dl, per cui è meglio somministrare i colloidi).

Velocità di infusione = 2-6 ml/kg/h

(Abrams – Ogg, 2004; Lubas, 2011; Carli, 2013; Lubas, 2015).

Crioprecipitato

Volume prodotto plasmatico (ml) = Peso ricevente (Kg) x K x [livello fattore desiderato – livello attuale ricevente (U/ml)] / livello del fattore nel prodotto plasmatico (U/ml)

K = 85 = volume medio ematico in ml/kg in proporzione al peso corporeo.

In linea generale si trasfonde 1U/10 Kg che può essere ripetuta secondo la necessità ogni 4-12 ore, corrispondenti a 10 ml/Kg, ma si può arrivare sino a 30 ml/kg. Se non è conosciuto il livello del fattore nel plasma basta considerare che empiricamente 1 ml di plasma contiene circa 1 unità di attività del fattore della coagulazione (Lubas, 2011; Davidow, 2013).

E' fondamentale un costante monitoraggio del paziente durante tutta la trasfusione per identificare l'insorgenza di eventuali reazioni trasfusionali, inizialmente ogni 15 – 30 minuti e successivamente dopo 1, 12 e 24 ore. E' fortemente consigliato il ricovero del ricevente almeno per le 24 ore successive alla trasfusione. Il monitoraggio prevede la valutazione e la registrazione dei seguenti parametri: (1) stato del sensorio e comportamento (atteggiamenti di sofferenza o disagio o qualsiasi segno sospetto di reazione trasfusionale); (2) frequenza respiratoria ; (3) frequenza cardiaca e caratteristiche del polso, (4) mucose apparenti esplorabili mediante il TRC ; (5) temperatura rettale ; (6) pressione arteriosa sistolica – media – diastolica. Uno studio sperimentale sulle variazioni dei parametri vitali dei soggetti sottoposti a trasfusione ha riscontrato : (1) riduzione iniziale della temperatura dovuto alla somministrazione di un liquido che, benchè scaldato, risulta ad una temperatura inferiore rispetto a quella corporea, con aumento finale in risposta ad

un prodotto non self ; (2) incremento iniziale della FC dovuto all'anemia e riduzione successiva per migliore ossigenazione dei tessuti ; (3) aumento statisticamente significativo di pressione media e diastolica ,principalmente per incremento del volume intravascolare ; (4) miglioramento statisticamente significativo del colore delle mucose per incremento della volemia e della componente eritrocitaria. Il valore Hct deve essere misurato prima della trasfusione ed entro 1-2 ore dal termine della trasfusione, e possibilmente dopo 24 ore per valutare la risposta dell'organismo ed evidenziare eventuale perdite continue o emolisi . In caso di anemia non rigenerativa in assenza di sanguinamento o emolisi circa il 70% degli eritrociti trasfusi sopravvive alle prime 24 ore e potenzialmente mantiene una durata in circolo normale, 110 giorni, per cui il soggetto viene stabilizzato a lungo termine permettendo di completare il pannello diagnostico o terapeutico. Al contrario nei soggetti affetti da anemia emolitica la trasfusione apporta un beneficio puramente temporaneo, in quanto i globuli rossi trasfusi vengono rapidamente distrutti insieme a quelli propri del ricevente dal processo emolitico (Giger, 2009; Mackin, 2013).

Dopo la prima ora inoltre è necessario monitorare almeno una volta la colorazione di plasma e urine per identificare eventuale emolisi (Lubas, 2015).

1.6 REAZIONI TRASFUSIONALI

Per reazione trasfusionale si intende ogni evento avverso collegabile con la trasfusione: la somministrazione di un qualsiasi prodotto e componente ematico rappresenta infatti una potenziale fonte di rischio per il ricevente, in quanto prodotto biologico e quindi possibile fomite di agenti infettivi o reazioni avverse (Chiaramonte, 2004; Giger, 2009; Tocci, 2010; Davidow, 2013 ; Lubas, 2015 ; McMichael, 2015 ; Agnoli,2015).

Il rischio di effetti collaterali normalmente viene minimizzato seguendo le corrette pratiche trasfusionali: appropriata selezione e screening del donatore, esecuzione di tutti i test pre-trasfusionali e adeguata raccolta –preparazione – conservazione della sacca di sangue. In realtà è stato dimostrato che reazioni ed effetti avversi possono manifestarsi ugualmente, pertanto il ricorso alla terapia trasfusionale richiede un'attenta analisi dei rischi e dei benefici terapeutici nel paziente (Tocci, 2010; Lubas, 2015).

Diversi studi effettuati nel cane riportano una frequenza relativamente bassa di reazioni trasfusionali (Weinstein, 2012; McMichael,2015; Bruce,2015; Agnoli,2015).

Tuttavia tali reazioni potrebbero essere in realtà sottovalutate dal clinico a causa della complessità della presentazione clinica del paziente che necessita di trasfusione della difficoltà di distinzione dalla sintomatologia già in atto, spesso molto simile (McMicheal,2015; Agnoli,2015). A titolo di esempio è possibile ricordare l'emolisi in pazienti affetti da IMHA, sintomi respiratori in pazienti affetti da sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) o immunodepressione in pazienti affetti da patologie di natura infettiva(Agnoli,2015).

Le reazioni trasfusionali includono alterazioni metaboliche e immunologiche provocate dal sistema antigeni-anticorpi anti-eritrocitari, proteine plasmatiche, globuli bianchi o piastrine; possono essere contemporanee o successive ad una trasfusione. Sono classificate in base all'eziologia (1) in immuno-mediate e non immuno-mediate e, in base al tempo di insorgenza (2), in acute (si verificano entro 48 h ma in genere compaiono durante o entro 1-2 ore al massimo) o ritardate (possono accadere a partire anche da una settimana). Questa classificazione è puramente didattica in quanto frequentemente tali meccanismi possono essere contemporanei e compresenti, determinando nel paziente la comparsa di una sintomatologia multifattoriale e di difficile interpretazione. Le reazioni trasfusionali possono essere lievi, moderate o addirittura fatali e possono ridurre o annullare i benefici della trasfusione; in linea generale la loro gravità è tendenzialmente proporzionale al quantitativo di sangue trasfuso, alla tipologia e alla concentrazione degli anticorpi coinvolti e alla condizione patologica di partenza del cane ricevente (Chiaramonte, 2004; Tocci, 2010; Vlaar,2013; Lubas, 2015; McMicheal, 2015; Agnoli,2015).

Una qualunque reazione trasfusionale deve essere diagnosticata rapidamente e trattata con la sospensione immediata dell'infusione e con la terapia sintomatica più opportuna; alcuni autori hanno suggerito una premedicazione del paziente con corticosteroidi o antistaminici ma non vi è supporto nella letteratura veterinaria, e sono necessari ulteriori studi per giustificare l'uso di questi farmaci (Bruce, 2015; Agnoli,2015).

La procedura standard di intervento in corso di reazione trasfusionale prevede: sospensione della trasfusione; visita completa del paziente con monitoraggio di temperatura, polso, mucose e pressione; esecuzione di esami emato-biochimici, inclusa l'analisi delle urine, stando attenti all'eventuale comparsa di ittero; possibile esecuzione di ECG e radiografia polmonare; eventuale terapia di supporto con antistaminici e corticosteroidi.

1.61 REAZIONI TRASFUSIONALI ACUTE IMMUNO-MEDIATE

Emolisi immuno-mediata o Acute Hemolytic Transfusion Reaction o AHTR

Le reazioni emolitiche acute sono le più frequenti reazioni trasfusionali immuno-mediate viste nei pazienti veterinari e sono anche le più gravi. Sono classificabili come reazioni da ipersensibilità di II tipo, in quanto provocate dalla presenza di allo-anticorpi circolanti, naturali o indotti, diretti contro gli antigeni eritrocitari del donatore; tali anticorpi interagendo con gli antigeni, attivano il complemento e innescano la produzione di citochine, scatenando una risposta infiammatoria sistemica. Il rischio è maggiore nei cani che hanno già subito una trasfusione e, in particolare, nel caso in cui ad un soggetto DEA 1 negativo già sensibilizzato sia somministrato nuovamente sangue DEA 1 positivo. La gravità e il tempo di insorgenza dipendono dalla classe di anticorpi coinvolta (IgG o IgM) e dal numero di eritrociti distrutti. La reazione emolitica può verificarsi attraverso meccanismi emolitici intra- o extra-vascolari, ed esita in: (1) mancato rialzo dell'Hct; (2) emoglobinemia;(3)emoglobinuria;(4)vasocostrizione;(5) ischemia renale con insufficienza renale acuta;(6)coagulazione intravasale disseminata. I segni clinici sono correlati all'emolisi intravascolare e includono ipotensione, tachicardia, tachipnea, piressia, salivazione, vomito, incontinenza, shock e morte. Il trattamento dipende dalla gravità, in ogni caso la priorità è risolvere l'ipotensione e mantenere un adeguato flusso sanguigno renale. Se si sospetta l'insorgenza di emolisi acuta, è necessario interrompere la trasfusione e infondere cristalloidi e/o colloidi per ristabilire la pressione sanguigna (valore medio: 60-70 mm Hg),mantenere la perfusione renale e la produzione di urina (1-2 mL/kg/h). Successivamente è bene verificare il prodotto che è stato impiegato ripercorrendo gli steps precedenti alla trasfusione, inclusa la ri-esecuzione del cross-matching test (Lanevski, 2001; Bracker,2005; Wardrop,2007; Geiger, 2007; Tocci, 2010; Lubas, 2011; Lubas, 2015; McMichael, 2015; Agnoli, 2015).

Reazioni febbrili non emolitiche o Febrile Non-Haemolytic Transfusion Reactions o FNHTR

Reazione trasfusionale più frequente sia in medicina umana che veterinaria e consiste in una forma di ipertermia acuta definita come un aumento di uno o più gradi corporei, associato ad una trasfusione in assenza di emolisi. La reazione febbrile non emolitica è autolimitante, non prevedibile e legata ad una reazione immuno-mediata contro i leucociti e le piastrine del donatore o comunque ad una stimolazione citochinica. L'incidenza di questa

reazione viene ridotta notevolmente grazie all'esecuzione della leucoriduzione del prodotto prima della sua conservazione. Si manifesta con febbre persistente fino a 20 ore successive alla trasfusione, talvolta tremori e vomito. E' importante monitorare il paziente in modo costante e prestare attenzione ad ogni variazione della temperatura, in quanto il rialzo febbrile può essere indicatore precoce di reazioni molto più gravi e pericolose come l'emolisi o una sepsi. La terapia consiste nell'interrompere la trasfusione e somministrare FANS ad effetto antipiretico, se necessari (in genere si risolve spontaneamente). (Lanevski, 2001; Wardrop, 2007; Tocci, 2010; Lubas, 2011; Davidow, 2013; Lubas, 2015; Agnoli, 2015). Nell'uomo queste reazioni rispondono al trattamento con antipiretici e si preferisce somministrare acetaminofene rispetto ai salicilati. In Medicina Veterinaria questo principio attivo è controindicato a causa della tossicità di un suo metabolita intermedio che non viene adeguatamente smaltito dalla clearance epatica, per un deficit di glutazione proprio dei piccoli animali, e accumulandosi ha quindi azione epato-tossica (Geiger, 2007; Tocci, 2010).

Reazioni allergiche – anafilassi da ipersensibilità

Reazioni di ipersensibilità di tipo I IgE- IgG mediate (minormente anche da IgA), scatenate da sostanze solubili nel plasma del donatore che si legano alle IgE preformate esposte sulla superficie dei mastociti, stimolano l'attivazione e il rilascio di istamina. L'eventuale fissazione del complemento da parte di anticorpi della classe IgG determina il rilascio delle anafilotossine C3a e C5a. Possono essere di intensità variabile, da lievi sino a fatali per il soggetto, in ogni caso inibiscono qualsiasi beneficio apportato al paziente. I segni tipici sono prurito, scialorrea, vomito, diarrea, dispnea da broncocostrizione; la febbre non è un reperto comune in queste forme. Possono instaurarsi orticaria e angioedema; raramente si arriva all'anafilassi con ipotensione, polso debole, pallore delle mucose sino a collasso, ascite, versamento pleurico ed edema polmonare nelle forme più gravi. Il trattamento consiste nel sospendere immediatamente la trasfusione, valutare eventuale presenza di emolisi e segni shock, somministrare antistaminici in presenza di orticaria (Lanevski, 2001; Wardrop, 2007; Tocci, 2010; Lubas, 2011; Davidow, 2013; Lubas, 2015).

Danno polmonare acuto da trasfusione o Transfusion - Related Acute Lung Injury o TRALI

Grave reazione clinicamente simile alla sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), si manifesta entro 6 ore dalla trasfusione, con grave edema non cardiogeno, in pazienti che

non presentano danno polmonare prima della somministrazione. Il meccanismo è ancora parzialmente sconosciuto, sono stati supposti due meccanismi eziopatogenetici : (1) meccanismo immuno-mediato legato alla probabile reazione di anticorpi anti-leucocitari del donatore contro antigeni sulla superficie neutrofilica nel ricevente a livello del microcircolo polmonare; (2) meccanismo non immuno-mediato legato ad un danno all'endotelio dei vasi polmonari con attivazione di citochine e rilascio di selectine che stimolano l'adesione dei neutrofili, associato ad un secondo insulto provocato dal rilascio di ossidasi e proteasi . L'ipotesi principale vede TRALI come l'esito comune di due diversi eventi, attivazione neutrofilica e deficit vascolare. In medicina veterinaria è stata riscontrata in seguito a trasfusione sia di sangue intero che di emocomponenti. I segni clinici riscontrabili sono tachipnea, febbre, tachicardia, ipossiemia senza evidenza di sovraccarico circolatorio. La diagnosi di TRALI avviene principalmente per esclusione, dopo aver effettuato, sulla base dei segni clinici, diagnosi differenziale con sovraccarico circolatorio associato alla trasfusione (TACO), AHRT, contaminazione batterica e reazione anafilattoide. La terapia è a base di ossigeno, somministrazione di fluidi e, nei casi gravi, ventilazione meccanica (Tocci, 2010; Davidow,2013; Vlaar,2013).

1.62 REAZIONI TRASFUSIONALI ACUTE NON IMMUNOMEDIATE

Le reazioni non immuno-mediate sono dovute prevalentemente ad errori avvenuti durante la conservazione o la somministrazione di prodotti trasfusionali (Lubas, 2011).

Sepsi associata a trasfusione

Condizione di shock endotossico da contaminazione e sovracrescita batterica nel prodotto trasfusionale. E' molto frequente la contaminazione, con batteri Gram positivi, dei prodotti piastrinici conservati a temperatura ambiente (20-24°C). I segni clinici associati sono quelli dello shock settico: febbre, ipotensione, CID e danno renale. Nel caso in cui sia sospettata tale reazione è necessario sospendere immediatamente la trasfusione ed eseguire un'emocoltura sia sulla sacca che sul paziente. La terapia consiste nel trattamento sintomatico dello shock e nella somministrazione di antibiotici (Lanevski,2001; Wardrop, 2007; Tocci, 2010; Lubas 2015).

Ipervolemia e sovraccarico circolatorio associato a trasfusioni o Transfusion -Related Circulatory Overload o TACO

Reazione causata dalla somministrazione rapida e/o di un elevato volume di sangue intero o altri prodotti trasfusionali a pazienti normovolemici (ad esempio anemia cronica) o con problemi cardiaci, epatici o renali (la velocità di infusione in queste condizioni non dovrebbe superare i 4 ml/kg/h). La maggior parte dei prodotti trasfusionali determina un significativo aumento della componente oncotica, soprattutto quelli che contengono albumina (ad es. WB o FFP), e difatti vengono impiegati nei soggetti con grave edema periferico o ipotensione. L'ipervolemia e il conseguente edema polmonare sono rischi potenziali da mettere in conto nei soggetti normovolemici. E' necessario monitorare costantemente in corso di trasfusione la pressione sanguigna e l'eventuale insorgenza dei segni clinici correlati, tra cui tosse, tachipnea –ortopnea, dispnea e cianosi, aumento della pressione venosa centrale, edema polmonare e occasionalmente ascite. In caso di insorgenza occorre interrompere l'infusione, somministrare diuretici e ossigeno (Lanevski, 2001; Wardrop, 2007; Tocci, 2010; Lubas, 2011; Davidow, 2013; Lubas, 2015).

Emolisi non immuno-mediata

Reazione con comparsa di emoglobinemia ed emoglobinuria associate ad emolisi non immunomediata, dovute a vari fattori, tra cui esposizione degli eritrociti a temperature inadeguate durante la conservazione – manipolazione della sacca e/o concomitante somministrazione di farmaci o soluzioni ipotoniche. E' necessario differenziare questo tipo di reazione dalla reazione emolitica acuta immuno-mediata. (Wardrop, 2007; Giger, 2009; Tocci, 2010; Lubas, 2011)

Intossicazione da citrato (ipocalcemia)

Fa parte delle complicazioni di trasfusioni massive, ovvero alterazioni metaboliche ed emostatiche conseguenti a trasfusioni massive e/o troppo rapide di FFP, sangue intero o piastrine. L'anticoagulante addizionato al prodotto trasfusionale (CPDA1) si lega al calcio ematico (fenomeno della chelazione) e in questo modo blocca la cascata della coagulazione. Nel caso in cui sia somministrato in grandi quantità si ha un sovraccarico della capacità di metabolizzazione del fegato, e questo determina nel ricevente un'ipocalcemia secondaria. I segni riscontrabili sono tremori, vomito, tetania, convulsioni e aritmie ventricolari. Può verificarsi anche con la somministrazione di piccoli volumi di prodotto trasfusionale, se l'anticoagulante è presente in eccesso. Per diagnosticare tale reazione è opportuno misurare

il calcio ionizzato e non il calcio sierico totale perché questo parametro rileva anche il calcio chelato. Normalmente i sintomi scompaiono con la sospensione della trasfusione in quanto il citrato viene metabolizzato molto rapidamente, in caso contrario è sufficiente somministrare gluconato di calcio 10% 0,5 – 1,5 ml/kg in 30 minuti monitorando la frequenza cardiaca (Rozanski, 2004; Wardrop, 2007; Tocci, 2010; Carli, 2013; Lubas, 2015).

Embolismo gassoso

Reazione che può verificarsi nel caso in cui l'aria entri in un sistema aperto o attraverso un catetere centrale, oppure qualora il sangue sia infuso in un sistema aperto a bassa pressione. I sintomi sono tosse, dispnea e shock. (Tocci, 2010).

Ipotermia

Reazione dovuta alla somministrazione di prodotto ad una temperatura troppo bassa, può esitare in aritmie ventricolari (Tocci, 2010; Lubas, 2015).

1.63 REAZIONI TRASFUSIONALI RITARDATE

Emolisi immuno-mediata ritardata o Delayed Hyperemolysis Transfusion Reaction o DHTR

Reazione caratterizzata, in assenza di segni clinici acuti, da una rapida e inspiegabile caduta del patrimonio eritrocitario e del valore Hct del soggetto, e positività al test di Coombs in 3-14 giorni. E' dovuta alla produzione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni meno conosciuti dei globuli rossi, con conseguente insorgenza di un fenomeno di emolisi extravascolare ritardata. I segni clinici possono variare da episodi febbrili sino all'ittero. Questo tipo di reazione è possibile in quanto questi anticorpi prima della trasfusione sono presenti nel sangue del donatore a titolazioni molto basse e non sono rilevabili dai test di cross-matching . Se sospettata è necessario testare un campione di sangue fresco del ricevente per la ricerca di anticorpi inaspettati (Lanevski, 2001; Wardrop, 2007 ; Tocci, 2010 ; Lubas, 2011).

Precoce distruzione dei GR del donatore

Reazione dovuta principalmente a inappropriata conservazione - somministrazione del prodotto e alle “storage lesions”, determina emolisi pre-trasfusionale nella sacca spesso conusa con emolisi intravascolare (Lubas, 2015).

Trasmissione di malattie infettive

Reazione trasfusionale ritardata non immuno-mediata provocata dall'inoculazione di agenti infettivi trasmissibili per via ematica: nel cane *Babesia spp*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*, *Anaplasma spp.* , *Dirofilaria*, *Rickettsia rickettsi*. A scopo preventivo ogni donatore andrebbe sottoposto a screening periodici per rilevare eventuali positività per le malattie infettive trasmissibili (Lanevski, 2001; Wardrop, 2007 ; Lubas,2015).

CAPITOLO 2

REGOLAMENTAZIONE GIURIDICA DELLA MEDICINA TRASFUSIONALE

2.1 – LEGISLAZIONE ITALIANA DELLA MEDICINA TRASFUSIONALE VETERINARIA

La trasfusione è una procedura che consente il trasferimento di sangue (sotto forma di sangue intero, componenti o derivati) da un soggetto donatore sano ad un soggetto ricevente. E' considerata una sorta di trapianto, potenzialmente soggetta a rischio di incompatibilità (reazioni trasfusionali), per questo richiede una puntuale regolamentazione giuridica (Lubas, 2015).

In Italia la pratica trasfusionale veterinaria è regolata dalla “Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario”, approvata dalla Conferenza Stato-Regioni il 17 dicembre 2015 e pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale del 3 febbraio 2016 n.25 (modifica della precedente Linea Guida, G.U. n. 32 del 07/02/2008). La necessità del Ministero della Salute (mediante il Dipartimento per la sanità pubblica veterinaria, la nutrizione e la sicurezza degli alimenti – Direzione Generale della sanità animale e del farmaco veterinario – Ufficio VI) di emanare una Linea Guida riguardante la medicina trasfusionale veterinaria deriva dall’impossibilità di utilizzare la normativa vigente in campo umano, e dall’insorgenza di problemi di carattere sanitario ; sono stati registrati infatti alcuni casi di anemia infettiva equina a sospetta trasmissione mediante trasfusione di plasma o sangue intero. Nella Linea Guida sono fissate e standardizzate le condizioni necessarie per la realizzazione della donazione a tutela del benessere animale e nel rispetto delle garanzie sanitarie, nonché i requisiti minimi igienico-sanitari dei donatori, delle strutture, del trasporto e della conservazione del sangue animale ad uso trasfusionale (Biagi, 2009).

Il testo è articolato in 10 articoli e 7 allegati indicanti: modalità di prelievo del sangue intero; criteri di idoneità alla donazione; preparazione, conservazione ed etichettatura del sangue;

trasporto; distribuzione e somministrazione del sangue; tracciabilità. Le specie animali contemplate sono cane, gatto e cavallo (Ministero della Salute, 2016; www.anmvioggi.it).

2.11 ARTICOLO 1 – Definizioni

Ai fini della presente linea guida si intende per:

Sangue intero = il sangue prelevato, per lo scopo trasfusionale, da animale donatore idoneo, con materiale sterile e in sacche autorizzate dal Ministero della Salute contenenti una soluzione anticoagulante – conservanti.

Prodotti derivati dal sangue = prodotti derivati dal frazionamento del sangue con mezzi fisici semplici.

Direttore sanitario = medico veterinario abilitato all'esercizio della professione che fornisce guida, direzione, supervisione e qualità assicurativa alla struttura veterinaria. Il Direttore sanitario è il responsabile dell'assistenza sanitaria agli animali, del rispetto del benessere animale e del coordinamento del personale sanitario operante nella struttura.

Sangue intero di pronto impiego o d'emergenza = sangue prelevato dal donatore e preparato all'interno della struttura veterinaria trasfusionale.

Uso eterologo = utilizzo di sangue o dei prodotti derivati da esso in un soggetto (detto ricevente) che risulta differente dal donatore.

Banca veterinaria del sangue = struttura veterinaria ove è esercitata l'attività di prelevare, analizzare, conservare e commercializzare il sangue prelevato da animale donatore idoneo, abituale o occasionale, e previo consenso del proprietario o del detentore che ne abbia la facoltà giuridica.

Struttura veterinaria trasfusionale = ambulatorio, clinica veterinaria o ospedale veterinario che svolge attività trasfusionale di pronto impiego o per emergenza esclusivamente al suo interno.

Animale donatore idoneo = animale le cui condizioni di salute sono documentate idonee alla donazione di sangue intra-specie da parte di personale sanitario Medico Veterinario e sulla base dei requisiti riportati nell'allegato 1 alle presenti linee guida.

Distress = condizione di non adattamento dell'animale a stimoli stressanti.

2.12 ARTICOLO 2 - Campo di applicazione

La presente linea guida si applica esclusivamente al sangue intero di origine animale prelevato da animale donatore idoneo, regolarmente registrato in anagrafe, di proprietà di persone giuridiche e/o fisiche per lo scopo trasfusionale.

2.13 ARTICOLO 3 - Fattispecie escluse dalla disciplina

La presente linea guida non si applica ai prodotti derivati dal sangue per uso eterologo, regolati dal *D.Lgs. 193/2006, No. 193* “Attuazione della Direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari” e successive modifiche.

2.14 ARTICOLO 4 – Prelievo di sangue intero

1. Il sangue prelevato per lo scopo trasfusionale dal donatore riconosciuto idoneo viene raccolto utilizzando materiale sterile e sacche contenenti una soluzione anticoagulante – conservante, previamente autorizzate dal Ministero della Salute.
2. Dopo aver accertato i requisiti di idoneità dell’animale donatore il medico veterinario effettua il prelievo di sangue intero, attuando una metodica che garantisce asepsi, mediante un sistema a circuito chiuso, compatibilmente con la specie animale, e con dispositivi non riutilizzabili.
3. Il direttore sanitario delle strutture di cui all’articolo 1 definisce un protocollo dettagliato delle procedure di prelievo, con particolare riguardo alla preparazione del paziente (area dell’ambulatorio/clinica/ ospedale / stalla/box tranquilla, pulita e silenziosa ; preparazione dell’area di prelievo con tricotomia, detersione e disinfezione) , alla quantità di sangue da prelevare e alle procedure in caso di emergenza clinica per il donatore o per il ricevente, e vigila sulla sua applicazione. Ad ogni venipuntura praticata è utilizzato un nuovo dispositivo di prelievo.
4. Preliminarmente al prelievo è necessario ispezionare le sacche per verificare l’assenza di difetti, la scadenza, l’aspetto e la quantità di anticoagulante in relazione al sangue prelevato. Dopo ciascun prelievo, i contenitori e le sacche sono accuratamente ispezionati per verificare l’assenza di difetti. Sono inoltre adottate adeguate misure per evitare errori nell’etichettatura della sacca e delle corrispondenti provette. Le fasi della procedura per la raccolta di sangue sono descritte nell’allegato 1 alla presente linea guida (Ministero della Salute, 2016).

2.15 ARTICOLO 5 – Idoneità alla donazione, benessere animale e condizioni di biosicurezza

1. Ai fini della donazione è necessario valutare le condizioni generali di salute dell'animale donatore mediante accurata anamnesi e visita clinica completa, con esame obiettivo generale e particolare, con speciale riguardo agli stati di debilitazione, iponutrizione, edemi, anemia, ittero, cianosi, dispnea e lesioni cutanee. Le condizioni che definiscono l'idoneità alla donazione di sangue sono riportate nell'allegato 1. I criteri di esclusione permanenti e temporanei dell'animale candidato donatore e di protezione dell'animale ricevente sono indicati negli allegati 3 e 4 alla presente linea guida.
2. Ad ogni donazione l'animale donatore è sottoposto agli esami di laboratorio di cui all'Allegato 2, al fine di escludere stati patologici e positività degli indicatori delle malattie trasmissibili, nonché di individuare le principali caratteristiche immuno-ematologiche. Il proprietario o il detentore dell'animale donatore che ne abbia la facoltà giuridica, sottoscrive il modulo di cui all'allegato 7, riguardante lo stato di salute del medesimo.
3. I protocolli relativi ai controlli sanitari di cui all'allegato 2 sono aggiornati in caso di eventi epidemici che determinino maggior rischio di diffusione delle malattie trasmissibili già individuate, nonché a seguito di notifica di introduzione sul territorio nazionale di infezioni attualmente non segnalate.
4. Le procedure di donazione di unità di sangue intero non devono provocare sofferenza, stress o danni durevoli ai donatori. Il medico veterinario qualora lo ritenga opportuno al fine di tutelare il benessere dell'animale può praticare una sedazione al donatore (Ministero della Salute, 2016).

Allegato 1 – Idoneità alla donazione di sangue e procedura di raccolta del sangue

Nel cane il sangue per la donazione viene di norma prelevato dalla vena giugulare previa tricotomia, detersione e disinfezione dell'area di prelievo con il soggetto in stazione quadrupedale o in decupito laterale. Devono essere impiegate sacche autorizzate dal Ministero della Salute e la raccolta deve avvenire per gravità.

Elementi per l'idoneità alla donazione:

Peso corporeo	>25 Kg
Età	2 – 8 anni
Regolarmente vaccinati per:	Cimurro, Leptosirosi, Epatite, Parvovirosi, Rabbia
Carattere	Docile

Quantità da prelevare	1,5 – 2% del volume ematico corporeo al massimo ogni 3 mesi non superando i 18 ml/Kg
Profilassi Routinarie	Filariosi cardio-polmonare
Identificazione	Anagrafe di specie con microchip registrato su una banca dati

Allegato 2 – Esami obbligatori ad ogni donazione di sangue

Lo stato di salute del donatore deve essere verificato ad ogni donazione, oltre che con una visita clinica accurata, con un pannello di esami standard che può essere ampliato in base a situazioni epidemiologiche particolari. Queste informazioni devono essere trascritte o allegate alla cartella clinica dell'animale donatore, che deve essere conservata per tutta la durata dell'impiego dello stesso come donatore. Nell'esecuzione delle indagini volte all'identificazione di agenti infettivi trasmissibili per via ematica a discrezione del medico veterinario responsabile della struttura trasfusionale e secondo le condizioni epidemiologiche della zona in cui opera la struttura stessa, le indagini sierologiche possono essere sostituite o affiancate da indagini di biologia molecolare PCR. Tali indagini possono essere anche effettuate su pool di campioni. Nel caso in cui il pool testato risulti positivo, sono testati i singoli donatori / campioni.

Il pannello di esami di laboratorio da eseguire sul donatore è diverso a seconda della tipologia d'impiego del sangue: sangue intero reperibile in commercio e/o nelle banche del sangue veterinarie; sangue intero di pronto impiego o d'emergenza preparato all'interno della struttura veterinaria e da utilizzare all'interno della medesima senza possibilità di cessione ad altre strutture.

E' fatto obbligo di conservare alla temperatura di - 8°C / - 10°C per un anno una aliquota di 1 ml di siero /plasma e una aliquota di 1 ml di sangue intero con anticoagulante EDTA per ciascuna unità di sangue prodotta, al fine di ripetere le analisi qualora ci sia il sospetto o la dimostrazione di trasmissione di malattie infettive nel soggetto ricevente (Ministero della Salute, 2016).

Elenco degli esami di laboratorio da eseguire sul sangue intero di pronto impiego o d'emergenza:

Esame	Analiti
Gruppo sanguigno	DEA 1.1 (da eseguire solo alla prima donazione)
Emocromo	RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, Morfologia RBC WBC, Formula leucocitaria, Morfologia WBC PLT, Morfologia PLT Proteine plasmatiche totali Ricerca microscopica per <i>Babesia</i> spp. nel buffy coat*
Sierologico	Leishmania infantum a; Ehrlichia canis a; Babesia canis b*; Anaplasma phagocytophilum a ; Dirofilaria immitis a**

Legenda: * alternativo o unitamente all'indagine IFAT o PCR per Babesia canis; ** se in trattamento profilattico regolare si può omettere l'esame da apposita autocertificazione del proprietario/detentore (allegato 7); a= è possibile l'impiego di test rapidi di tipo ambulatoriale alternativo all'indagine IFAT o PCR; b = IFAT o PCR.

Elenco degli esami di laboratorio da eseguire su sangue intero reperibile in commercio:

Esami	Analiti
Gruppo sanguigno	DEA 1.1 a [DEA 1.2 (Aa), DEA 7 (Tr)] (da eseguire solo alla prima donazione)
Emocromo	RBC,Hgb,Hct,MCV,MCH,MCHC,RDW,Morfologia RBC WBC,Formula leucocitaria,Morfologia WBC PLT,MPV,Morfologia PLT Ricerca microscopica per Babesia spp. nel buffy coat*
Biochimico	Proteine plasmatiche totali, Albumina, Urea, ALT, ALP
Coagulazione	PT, aPTT, Fibrinogeno
Sierologico	Leishmania infantum a Ehrlichia canis a Anaplasma phagocytophilum a Rickettsia rickettsii b Babesia canis b* Dirofilaria immitis a** [Borrelia Burgdorferi b Brucella Canis c]
Urine	Chimico Fisico Sedimento
Parassitologico	Feci Ricerca microfilaria nel sangue periferico

Legenda: * in alternativa o unitamente all'indagine IFAT o PCR per Babesia canis; ** se in trattamento profilattico regolare si può omettere l'esame da apposita autocertificazione del proprietario/ detentore (allegato 7); a= è possibile l'impiego di test rapidi di tipo

ambulatoriale in alternativa all'esame IFAT o PCR; b- IFAT =Immunofluorescenza Indiretta; c- AGID= Immunodiffusione in Gel di Agar.

Note: gli esami indicati tra parentesi quadra non sono obbligatori

Allegato 3 - Criteri di esclusione permanente e temporanea dell'animale candidato donatore ai fini della protezione della sua salute

Un animale, al fine della tutela della sua salute, deve essere permanentemente giudicato non idoneo alla donazione di sangue se affetto (anche in precedenza) da una delle seguenti patologie: malattie autoimmuni e immuno-mediate; malattie cardiovascolari; malattie del sistema nervoso centrale e periferico; neoplasie o malattie maligne; tendenza anomala all'emorragia; crisi convulsive. Per gravi o croniche malattie gastrointestinali, ematologiche, respiratorie e renali non comprese nelle categorie di cui sopra, il medico veterinario responsabile della selezione può avvalersi di una consulenza specialistica prima di definire il giudizio di idoneità o non idoneità temporanea o permanente alla donazione. Possono sussistere motivi per i quali è necessario, ai fini della protezione della salute dell'animale candidato donatore, rinviare la donazione; la decisione relativa alla durata del periodo di rinvio spetta al veterinario responsabile della selezione. La gravidanza in atto costituisce un motivo di inidoneità temporanea (Ministero della Salute, 2016).

Allegato 4 - Criteri di esclusione permanente e temporanea dell'animale candidato donatore ai fini della protezione della salute dell'animale ricevente

Inidoneità permanente

Ai fini della protezione della salute dell'animale ricevente è dichiarato permanentemente non idoneo alla donazione di sangue l'animale candidato donatore affetto (anche in precedenza) da una delle seguenti patologie o condizioni: malattie autoimmuni e immuno-mediate; neoplasie maligne; endocrinopatie; epilessia; malattie cardiovascolari; glomerulonefrite cronica e pielonefrite; policitemia vera. Inoltre i cani sono inidonei se hanno contratto Babesiosi, Leishmaniosi, Ehrlichiosi, in presenza di titoli anticorpali > 1:80 e/o indagini PCR positive, e/o presenza di sintomatologia clinica.

Esclusione temporanea

In presenza di una delle seguenti patologie o condizioni l'animale candidato donatore è dichiarato temporaneamente non idoneo alla donazione di sangue per un periodo di tempo di durata variabile in funzione della patologia o condizione rilevata: nel cane si considerano

Anaplasmosi, Borreliosi e Brucellosi (dopo la guarigione clinica in presenza di titoli sierici negativi e indagine PCR negativa).

Rinvio temporaneo

1. Rinvio di sei mesi = trasfusione di sangue; trattamento con farmaci emoderivati; allergia a farmaci
2. Rinvio di tre mesi = somministrazione di sieri di origine animale
3. Rinvio di tre settimane = somministrazione di vaccini costituiti da virus o batteri vivi attenuati
4. Rinvio di 48 ore = somministrazione di vaccini costituiti da virus o batteri uccisi o inattivati o da tossoidi; assunzione di farmaci

Possono sussistere ulteriori motivi per il rinvio temporaneo della donazione ai fini della protezione dei riceventi. La decisione relativa alla durata del periodo di rinvio spetta al medico veterinario responsabile della selezione (Ministero della Salute, 2016).

2.16 ARTICOLO 6 – Consenso informato del proprietario dell'animale donatore o del detentore dell'animale donatore che ne abbia facoltà giuridica

Il proprietario dell'animale idoneo alla donazione di sangue è preventivamente informato che la procedura non è esente da rischi, ed è tenuto ad esprimere per iscritto il proprio consenso compilando il modulo di cui all'articolo 5, nel quale dichiara anche l'assenza di condizioni fisiche o cliniche, a lui note, di esclusione dell'animale dalla donazione.

2.17 ARTICOLO 7 - Strutture veterinarie e prelievo, preparazione, conservazione ed etichettatura del sangue intero

1. Le strutture veterinarie di cui all'articolo 1 devono rispettare le disposizioni di cui all'allegato 5.
2. Le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano disciplinano le modalità per il rilascio delle autorizzazioni delle strutture veterinarie di cui al comma 1.
3. La verifica della permanenza dei requisiti delle strutture al comma 1 deve essere effettuata con periodicità stabilita dalle Regioni e Province Autonome, sulla base dell'analisi del rischio.
4. Le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano forniscono l'elenco delle strutture veterinarie di cui all'art.1 al Ministero della Salute, che provvederà a pubblicarlo sul proprio sito internet.

5. Nelle strutture di cui al comma 1 il direttore sanitario : codifica un protocollo per la gestione delle procedure ed un manuale ad uso interno, in cui sono descritte le modalità operative ; assicura che tale documentazione sia costantemente aggiornata e che le procedure prevedano l'identificazione e la gestione efficace dei punti critici nel prelievo, preparazione e conservazione del sangue intero per le trasfusioni, al fine di minimizzare i rischi per la salute del donatore e dimostrarne l'effettiva applicazione.

6. Il sangue intero, prelevato utilizzando materiale sterile e sacche autorizzate dal Ministero della Salute (*decreto legislativo n. 37 del 25 gennaio 2010 e successive modifiche*) deve essere conservato in frigo-emoteca ad una temperatura di 4°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), per un periodo di tempo adeguato al tipo di anticoagulante-conservante impiegato, definito sulla base della sopravvivenza post-trasfusionale delle emazie uguale o superiore al 75% a 24 ore. I frigoriferi impiegati per la conservazione delle unità devono garantire una temperatura uniforme al loro interno, essere provvisti di termo-registratore e di gruppo di continuità dedicato.

7. La data di scadenza deve essere indicata in etichetta e si identifica con l'ultimo giorno in cui il sangue intero è utile agli effetti della trasfusione. L'impiego del sangue è consentito entro 35 giorni dal momento del prelievo. Sui contenitori di unità di sangue devono essere apposte etichette conformi a quanto indicato nell'Allegato 6 alle presenti linee guida (Ministero della Salute, 2011).

Allegato 5 – Requisiti strutturali, preparazione e conservazione del sangue

Le strutture veterinarie di cui all'articolo 1 possiedono i requisiti fissati dall' accordo Stato-Regioni (Atti n.1868 del 26 nov. 2003) concernente “la definizione dei requisiti strutturali, tecnologici, ed organizzativi minimi richiesti per l'erogazione delle prestazioni veterinarie da parte delle strutture pubbliche e private” pubblicato sul S.O. G.U.R.I. n. 297 del 23 dicembre 2003.

Le strutture veterinarie di cui all'articolo 1, dispongono delle suddette attrezzature: pinza multifunzione e anellini di alluminio o pinza saldatrice; frigo-emoteca a temperatura costante di 4-6°C con registratore e gruppo di continuità; agitatore meccanico per la raccolta del sangue intero; bilancia.

I locali di raccolta di sangue intero adottano le misure idonee a valutare e prevenire la diffusione delle malattie post-trasfusionali, principalmente quelle infettive. Per le operazioni di preparazione del sangue intero sono utilizzate sacche autorizzate dal Ministero della Salute. Le tipologie di prodotti emotrasfusionali ammesse sono: sangue

intero fresco (prelevato da meno di 6-8 ore); sangue intero conservato (prelevato da oltre 6-8 ore) ; sangue intero in predeposito per autotrasfusioni che consiste in un'unità di sangue intero prelevata al paziente cui è destinata per proprie esigenze terapeutiche. (Ministero della Salute, 2016).

Allegato 6 – Etichettatura del sangue intero

Su ciascuna sacca dovrà essere indicato tramite apposita etichetta: nome ed indirizzo della struttura di prelievo del sangue intero; numero identificativo della donazione; tipo del preparato; peso lordo del preparato; data di prelievo e preparazione; data di scadenza del prodotto; composizione e volume della soluzione anticoagulante-conservante e delle eventuali soluzioni aggiunte; gruppo sanguigno dell'animale donatore; modalità e temperatura di conservazione; indicazione della specie animale.

Nei seguenti preparati trasfusionali devono inoltre essere incluse le seguenti diciture:

1. sangue intero fresco, sangue intero conservato: *“esclusivamente per uso veterinario – specie di destinazione: ..., non utilizzabile a scopo trasfusionale se presenta emolisi o altre anomalie evidenti”, “per la trasfusione utilizzare un adatto dispositivo munito di appropriato filtro”*;
2. sangue intero da predeposito per autotrasfusioni. L'etichetta deve essere di colore diverso dalle omologhe e deve indicare la dicitura *“AUTODONAZIONE – STRETTAMENTE RISERVATA A: ...”*. Generalità del tutore dell'animale; firma del medico responsabile del salasso; tipo di preparato; la dicitura : *“Non utilizzare a scopo trasfusionale se presenta emolisi o altre anomalie evidenti”*; la dicitura: *“Per la trasfusione utilizzare un adatto dispositivo munito di appropriato filtro ; la dicitura “Esclusivamente per uso autologo – prove di compatibilità ed esami pre-trasfusionali NON ESEGUITI”* (Ministero della Salute, 2016).



Figura 2.1 -PRBCs e FFP con etichettatura a norma

Allegato 7 – Modulo per l’accertamento all’idoneità alla donazione

Il sottoscritto,C.F.....proprietario, detentore con facoltà giuridica, dell’animale identificato con nomen. identificazione..... nato il.....di sesso.....autorizza il Dottad effettuare le procedure necessarie per la donazione di sangue del proprio animale (visita clinica, analisi di laboratorio).

Dichiaro inoltre che il mio animale:

- non ha ricevuto vaccinazioni nelle ultime tre settimane,
- non ha ricevuto trasfusioni di sangue negli ultimi sei mesi,
- non ha subito interventi chirurgici di rilievo negli ultimi sei mesi,
- non ha mostrato allergie ai medicinali veterinari fin qui usati (elencare quali_____),
- non soffre, o ha sofferto, di patologie di cui all’allegato 3 delle “Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario” che mi sono state chiaramente indicate dal medico Veterinario.
- non è stato sottoposto ad alcun trattamento farmacologico negli ultimi 90 giorni precedenti la donazione, ovvero è stato trattato con i seguenti medicinali veterinari_la cui ultima somministrazione risale a_____
- (se femmina) non in stato di gravidanza

Data

FIRMA

Sede amministrativa
Viale delle Piagge 2
56124 Pisa
Tel. 0502216725

Sede Distaccata
Via Livornese
S. Piero a Grado

MODULO CONSENSO INFORMATO ALLA ESECUZIONE DELLA DONAZIONE DI SANGUE

Il sottoscritto _____, proprietario del cane di nome _____, nato il _____ di sesso _____ autorizza il Dott. _____ ad effettuare le procedure necessarie per prelevare una sacca di sangue intero.

Tali procedure seppure eseguite con perizia, possono comportare dei rischi tra cui lo stravasamento ematico nella sede del prelievo.

Sono stato correttamente informato sulla procedura di prelievo e sulla quantità di sangue che sarà prelevata al mio cane.

Dichiaro inoltre che il mio cane non ha mostrato segni di malattia nella settimana precedente al prelievo e che

- non soffre di attacchi epilettici,
- non è in stato di gravidanza se femmina,
- non ha ricevuto vaccinazioni nelle ultime tre settimane,
- non ha ricevuto trasfusioni di sangue negli ultimi sei mesi,
- non ha subito interventi chirurgici di rilievo negli ultimi sei mesi,
- non è allergico a farmaci,
- non soffre di malattie immuno-mediate,
- è stato sottoposto a profilassi continuativa per la filariosi cardio-polmonare in aderenza ad una prescrizione veterinaria

Data

FIRMA

Figura 2.2- Facsimile del modulo del consenso informato impiegato dal Centro Trasfusionale del Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa

2.18 ARTICOLO 8 - Trasporto, distribuzione e somministrazione del sangue

1. Il sangue intero deve essere trasportato in contenitori termoisolanti, dotati di appositi sistemi di controllo della temperatura interna e pre-raffreddati a 4°C. Il sangue deve essere trasportato ad una temperatura compresa tra 1°C e 10°C.
2. E' consentita la somministrazione di sangue intero solo a riceventi della stessa specie animale dei donatori, previo accertamento della compatibilità fra i suddetti. Presso ogni struttura trasfusionale deve essere adottato, per ciascuna unità di sangue, un sistema di riconoscimento sicuro dell'animale ricevente cui la stessa unità è stata assegnata (Ministero della Salute, 2016).

2.19 ARTICOLO 9 - Tracciabilità e registrazione dei dati

1. Le strutture di cui all'art.1 devono dotarsi di un sistema di registrazione e di archiviazione dei dati che consenta di ricostruire il percorso di ogni unità di sangue dal prelievo alla destinazione finale.
2. Le informazioni minime che devono essere rese disponibili alle autorità competenti per il controllo sono: identificazione dell'animale donatore / ricevente; identificazione del proprietario dell'animale donatore /ricevente; numero identificativo della donazione e data di scadenza presenti sulle etichette delle sacche di sangue e se del caso loro provenienza; la cartella clinica contenente i dati clinici dell'animale donatore che deve essere conservata per tutta la durata dell'impiego dello stesso come donatore ; eventuali reazioni avverse. La documentazione contenente le suddette informazioni deve essere disponibile per almeno 3 anni presso la struttura e, in caso di commercializzazione del sangue intero, deve essere vidimato dalla ASL competente per territorio (Ministero della Salute, 2016).

2.20 Articolo 10 – Reazioni Avverse

1. Eventuali reazioni avverse nell'animale donatore idoneo, ovvero nell'animale ricevente, sono immediatamente trattate secondo i protocolli clinici di buona pratica veterinaria.
2. Le procedure per la segnalazione di sospette reazioni avverse sono quelle disciplinate dall'articolo 91 del decreto legislativo n. 193/2006, e successive modificazioni.

2.2 – ANALISI CRITICA DELLA LINEA GUIDA e CONFRONTO TRA LE DUE VERSIONI

La “Linea Guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario” è un atto di natura amministrativa, non costituisce di per sé atto avente valore di legge ma rappresenta un impegno formalmente sancito di “leale collaborazione”, vincolante e con obbligatorietà di osservanza e attuazione da parte degli enti che lo hanno sottoscritto (Regioni e Stato). La sua emanazione deriva dalla necessità di colmare il vuoto normativo esistente in materia di medicina trasfusionale veterinaria, che aveva originato casi di scambi di sacche tra veterinari senza le necessarie garanzie, con possibili rischi per la salute animale e ipotizzabili ripercussioni. Tali problemi si sono riproposti in seguito, al verificarsi di alcuni casi di anemia infettiva equina probabilmente legati alla trasfusione di sangue infetto; tra le possibili cause vi può essere infatti anche la trasfusione ematica. Questa Linea Guida contiene pertanto indicazioni relative alla disciplina della gestione del sangue intero di origine animale (nello specifico di cane, gatto e cavallo), prelevato da animali di proprietà di persone giuridiche o fisiche a scopo trasfusionale. Al suo interno sono fissate norme di indirizzo e orientamenti finalizzati a garantire la protezione della salute del donatore e del ricevente e un utilizzo sicuro del sangue, distinti in base alla diversa destinazione del sangue prelevato (sangue intero di pronto impiego in situazioni di emergenza o sangue intero destinato alla commercializzazione). Più che la funzione direttiva e sanzionatoria, è importante mettere in risalto il valore educativo di questo testo nei confronti dei professionisti veterinari, in quanto indica loro le modalità con cui svolgere l’attività pratica nel rispetto delle esigenze del corretto esercizio della professione (Gavazza, 2008; Biagi, 2009; Masucci, 2011).

La Linea Guida contribuisce a qualificare e rendere trasparente l’impegno della categoria alla tutela della salute e del benessere animale, anche all’esterno (Gavazza, 2008).

Tuttavia, come sottolineato da diversi autori, per mantenere vivo questo obiettivo è importante che la Linea Guida non diventi causa di una minore fruibilità della trasfusione, mediante l’introduzione di requisiti non necessari, e che sia periodicamente sottoposta a revisione dal Ministero della Salute per migliorarne l’applicabilità e garantire maggiori condizioni di sicurezza al donatore e al ricevente, in funzione delle nuove tecnologie, metodiche e conoscenze scientifiche (Masucci, 2011).

Il problema principale di questa normativa, sollevato da numerosi autori e oggetto di intenso dibattito nel mondo veterinario, a partire dalla versione originaria pubblicata nel 2008, è rappresentato dal campo di applicazione: a differenza della normativa relativa alla medicina trasfusionale umana (Legge 4 maggio 1990, n.107), la Linea Guida veterinaria si applica solamente al sangue intero, escludendo tutti gli emoderivati- emocomponenti e le attività connesse, attualmente ancora regolamentati dal D.Lgs. 193/2006 (relativo al medicinale veterinario). Secondo la normativa italiana gli emoderivati e gli emocomponenti rientrano nella definizione di medicinale veterinario (a sensi del D.Lgs. 193/2006 “*ogni materia indipendentemente dall'origine; tale origine può essere... animale, come microrganismi, animali interi, parti di organi, secrezioni animali, tossine, sostanze ottenute per estrazione, prodotti derivati dal sangue.*”) e pertanto la loro produzione e il loro utilizzo sono vincolati dalla necessità di possedere regolare autorizzazione all'immissione in commercio, mentre dovrebbero trovare collocazione normativa più idonea all'interno della medicina trasfusionale veterinaria (Gavazza, 2008 ; Biagi, 2009 ; Ferri, 2013).

La restrizione del campo di applicazione della Linea Guida rappresenta un forte limite per la pratica trasfusionale veterinaria: nella pratica clinica si preferisce infatti ricorrere agli emocomponenti, ottenuti per centrifugazione e successiva separazione dei componenti del sangue, piuttosto che al sangue intero, perché si ritiene eticamente più corretto non esporre il paziente a componenti non necessari per il trattamento della sua patologia. Oltretutto, gli emocomponenti permettono di ottimizzare e allungare la conservabilità delle componenti ematiche, e sono più facilmente ottenibili rispetto agli emoderivati, che sono specialità medicinali ricavati da processi di lavorazione industriale (Penocchio, 2013).

A tal proposito la Federazione Nazionale Ordini Veterinari Italiani (FNOVI) ha inviato, nel 2013, una richiesta di chiarimento al Ministero della Salute per definire i vincoli normativi dei vari prodotti del sangue e soprattutto la loro collocazione giuridica, in funzione dell'utilizzo crescente degli emocomponenti nella pratica veterinaria e della scarsa reperibilità di sostanze alternative sul mercato (Penocchio, 2013).

La Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci veterinari ha risposto, in una nota, che, attualmente, solo l'utilizzo del sangue intero è regolamentato dalla Linea Guida. Tuttavia, considerati i potenziali sviluppi della terapia trasfusionale, la questione è stata trasmessa alla Commissione Europea, nel periodo di revisione della Direttiva 2001/82/CE “recante un codice comunitario relativo ai medicinali veterinari”, con la speranza di

ottenere una modifica per escludere dal campo di applicazione sangue intero, plasma ed emoplasti (Ferri, 2013). Attualmente non sono stati fatti passi avanti in tal senso.

Il 17 dicembre 2015 la Conferenza tra Stato, Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano ha approvato una versione modificata della “Linea Guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario”. Rispetto al vecchio testo, la nuova versione esordisce con un articolo dedicato alle “definizioni” e si arricchisce di indicazioni e specifici allegati a proposito di : (1) sottoscrizione del consenso informato alla donazione da parte del proprietario dell’animale donatore (a tutela del Medico Veterinario), in cui sono indicate le modalità di prelievo ed eventuali rischi (Allegato 7 con facsimile del modulo) ; (2) autorizzazione, caratteristiche e requisiti strutturali, tecnologici e organizzativi delle strutture veterinarie che intendono svolgere attività trasfusionale, differenziando tra strutture deputate alla commercializzazione e strutture che effettuano attività trasfusionale di emergenza e producono sangue da utilizzare unicamente al proprio interno (Allegato 5); (3) chiara definizione dei compiti e delle responsabilità del Direttore Sanitario della struttura. Sono altresì specificati e chiariti, rispetto alla versione antecedente, tali elementi : (1) rispetto del benessere animale e necessità di evitare dolore al donatore durante il prelievo, anche con la possibilità di ricorrere alla sedazione; (2) obbligo di eseguire ,preliminarmente alla donazione, un’ accurata anamnesi necessaria ad acquisire dati su malattie recenti di natura non determinata (che porterebbero all’esclusione) e sull’esposizione a fattori di rischio (ad es. viaggi in zone endemiche per malattie trasmissibili con sangue, infestazione da ectoparassiti..); (3) obbligo di eseguire prove di compatibilità crociata nel cane, qualora il ricevente sia già stato sottoposto in precedenza ad una trasfusione o abbia avuto gravidanza; (4) obbligo della determinazione del gruppo sanguigno DEA 1.1 (requisito minimo in quanto gruppo maggiormente antigenico) ma anche 1.2 (anch’esso in grado di dare reazioni) per il sangue reperibile in commercio; (5) obbligo di tracciabilità di ogni singola unità di sangue intero, mediante un sistema di registrazione e di archiviazione dei dati necessari a ricostruire il suo percorso dal momento del prelievo fino alla destinazione, insieme alla conservazione di un’aliquota di siero/plasma e sangue intero del donatore per poter verificare i risultati delle indagini compiute, in caso di reazioni avverse del ricevente ; (6) estensione dell’esclusione temporanea dalla donazione nel caso in cui il donatore sia sottoposto a terapie farmacologiche (rinvio di 48 ore) ; (7) esclusione permanente dalla donazione dei soggetti positivi sierologicamente /PCR/clinicamente a Babesiosi, Leishmaniosi, Ehrlichiosi e anche Anaplasmosi (prima assente) ; (8) esclusione temporanea dei soggetti risultati

positivi alla Borreliosi sino alla completa guarigione clinica ; (9) distinzione del sangue intero ricavato in due tipologie, ovvero sangue raccolto in emergenza con uso immediato e sangue reperibile in commercio. La versione aggiornata della Linea Guida ha introdotto importanti modifiche anche riguardo lo screening delle malattie infettive nei cani donatori, distinguendo la distinzione dei metodi impiegati in base alla tipologia di sangue in questione ; in linea generale per lo screening del sangue raccolto in emergenza sono previsti solo test rapidi e di facile esecuzione, al contrario per il sangue commercializzato vengono eseguiti test dotati di maggiore sensibilità diagnostica, che richiedono tempi di esecuzione più lunghi e il ricorso a laboratori specializzati. Nello specifico per la diagnosi delle malattie trasmissibili con il sangue nel nostro Paese, quali *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, si devono impiegare test sierologici rapidi nel caso del sangue prelevato in emergenza, altrimenti test IFA o ELISA. Per *Babesia canis* non è disponibile un test rapido alternativo alla sierologia e l'esame microscopico del buffy coat ha scarsa specificità, pertanto si dovrebbero utilizzare IFAT o PCR. Per il sangue reperibile in commercio i donatori andrebbero testati con sierologia e PCR per tutti i patogeni elencati. E' necessario sottolineare la presenza di diversi aspetti tutt'ora invariati rispetto al passato che, secondo diversi autori, necessitano di modifiche sostanziali :

Campo di applicazione = riguarda ancora esclusivamente il sangue intero ed esclude gli emocomponenti e gli emoderivati (regolamentati dalla legislazione sul farmaco) mantenendo un vincolo piuttosto importante per la pratica trasfusionale (come già discusso in precedenza).

Requisiti di idoneità alla donazione = (1) l'età minima potrebbe essere abbassata a 18 mesi e, solo per cani di peso > 40 Kg, quella massima a 6 anni ; (2) negli animali obesi sarebbe meglio fare riferimento al peso ideale per calcolare il volume di sangue da prelevare; (3) la vaccinazione antirabbica potrebbe non essere indicata in quanto legata ad un obbligo epidemiologico ma non vincolante per la donazione ; (4) la non docilità del soggetto non dovrebbe più comportare l'esclusione dal parco donatori, dal momento che è stata riconosciuta la possibilità di ricorrere alla sedazione per preservare il benessere animale; (5) la quantità massima di sangue che è possibile prelevare senza rischio è rappresentata dal 20% del volume ematico totale e non l'1,5-2%; (6) ai cani donatori dovrebbe essere richiesta una profilassi routinaria anche contro gli ectoparassiti.

Criteri di esclusione del donatore = (1) l' esclusione permanente dovrebbe essere estesa anche ai soggetti risultati positivi sierologicamente /PCR /clinicamente all'Anaplasmosi e alla Bartonellosi (ancora una volta non citata nella Linea Guida), e ai donatori

precedentemente trasfusi ,nel caso in cui non siano sottoposti ogni volta a test di compatibilità crociata ; (2) la somministrazione al donatore di vaccini inattivati o costituiti da tossoidi e l'allergia a farmaci non costituisce minaccia per la salute del ricevente e quindi tale causa di esclusione temporanea dalla donazione dovrebbe essere eliminata.

Pannello di esami da effettuare ad ogni donazione: (1) si ritiene necessaria l'integrazione della VES alla misurazione delle proteine plasmatiche nel cane in qualità di indice di flogosi; (2) possibilità di esclusione del profilo coagulativo, nel caso del sangue conservato, a causa della labilità dei fattori della coagulazione testati; (3) possibilità di esecuzione, per il sangue reperibile in commercio, sui donatori abituali, un profilo di analisi biochimiche associate ad analisi di urine e feci con una frequenza anche inferiore a quella richiesta di 1 -2 volte l'anno; (4) estensione dei test di screening anche per *Bartonella*, trasmessa sperimentalmente con sangue infetto ; (5) necessità di eseguire esame sierologico per *Dirofilaria immitis* in associazione all'esame microscopico per la ricerca di microfilarie di specie diverse per cui ancora non esistono test sierologici specifici ; (6) possibilità di eliminare gli esami per *Borrelia burgdorferi* in quanto molto probabilmente non trasmissibile mediante trasfusione (Masucci, 2013).

CAPITOLO 3

MALATTIE EMOTRASMISSIBILI E SCREENING DEI DONATORI

3.1 – MALATTIE TRASMISSIBILI CON LA TRASFUSIONE : CVBDs o CANINE VECTOR -BORNE DISEASES

Le CVBDs (Canine Vector – Borne Disease) o malattie canine trasmesse da vettori comprendono un gruppo complesso di malattie infettive/infestive provocate da un'ampia gamma di patogeni, comprendente virus, batteri, protozoi ed elminti, che sono trasmessi da diversi tipi di vettori ematofagi come zecche, pulci, zanzare e flebotomi. Il gruppo include Anaplasmosi, Babesiosi, Bartonellosi, Dirofilariosi, Ehrlichiosi, Leishmaniosi, Rickettsiosi e Telaziosi, oltre a tutte le numerose nuove sindromi scoperte ogni anno (Otranto, et al., 2009; Otranto, et al., 2010; Baneth, et al., 2012; Vascellari, et al., 2016).

Tra tutte le CVBDs Ehrlichiosi Monocitica Canina, Leishmaniosi e Filariosi ricoprono un ruolo di maggiore rilevanza da un punto di vista epidemiologico e sanitario, in quanto enzootiche in tutta l'Europa Meridionale, inclusa l'Italia (Beugnet, et al., 2009).

Alcune di queste patologie (Leishmaniosi, Filariosi Cardiopolmonare, Babesiosi) sono ritenute di maggior importanza in quanto possono provocare gravi e, in alcuni casi fatali, condizioni cliniche nei cani infetti (spesso dopo un lungo periodo di incubazione) e rendere piuttosto complicata la loro diagnosi soprattutto per la presenza di segni clinici non patognomonic. E' importante inoltre sottolineare come alcuni tra gli agenti patogeni responsabili di CVBDs (ad. es. *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella spp.*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*.) abbiano anche un'importante valenza zoonotica, e costituiscano un emergente problema di sanità pubblica a livello mondiale, soprattutto per il ruolo da reservoir della popolazione canina infetta. (Dantas-Torres, et al., 2007; Beugnet, et al., 2009; Otranto, et al., 2009, 2009, 2010; Testini, et al., 2010; Baneth, et al., 2012).

Al giorno d'oggi le CVBDs rappresentano un crescente problema a livello globale a causa della loro continua espansione sempre più lontano dai tradizionali confini geografici e

temporali, come risultato dei cambiamenti a livello climatico e nelle regole sugli spostamenti dei cani domestici, che hanno determinato l'esposizione di nuove popolazioni ad agenti infettivi prima sconosciuti. (Beugnet, et al., 2009; Baneth, et al., 2012).

Diversi fattori sono legati ai cambiamenti epidemiologici delle malattie trasmesse da vettori, in particolare il marcato incremento dei trasporti a distanze sempre maggiori via terra, mare o aria negli ultimi vent'anni, con intensi spostamenti di animali, sia zootecnici che da compagnia o da sport. Queste movimentazioni infatti creano condizioni ideali per la circolazione e lo scambio dei patogeni, specialmente nel momento in cui gli animali da compagnia viaggiano insieme ai proprietari. Cambiamenti ambientali, ad esempio per la realizzazione di parchi ricreativi o aree suburbane con spazi verdi e giardini privati, favoriscono l'instaurarsi di nicchie di vettori artropodi (ad esempio zecche, zanzare e mosche) e ospiti peri-domestici (roditori); così come in altre parti del mondo la costruzione di dighe e laghi artificiali può creare condizioni favorevoli per la sopravvivenza dei vettori. Misure per proteggere la fauna selvatica, in associazione con attività di riabilitazione del territorio e pratiche di gestione, soprattutto nella silvicoltura, hanno contribuito alla ripopolazione di cervi, caprioli, cinghiali e volpi che sono animali ospiti per i principali vettori artropodi ad attività ematofaga. Variazioni di temperatura e umidità e in generale i cambiamenti climatici (al di là del semplice rialzo delle temperature medie) possono potenzialmente influenzare, anche rapidamente, abbondanza e distribuzione delle popolazioni di vettori come zecche, pulci, zanzare, flebotomi e *Culicoides*; il riscaldamento globale ha determinato l'insorgenza di condizioni meteorologiche instabili con fenomeni acuti come piogge, inondazioni e tempeste che possono agevolare le popolazioni di vettori locali e permetterne l'estensione verso nuovi territori (ad esempio la riduzione del periodo invernale ha permesso alle zecche di essere attive per tutto l'anno in un'area maggiormente estesa) (Beugnet, et al., 2009).

In risposta a questa emergenza il CVBD World Forum, un gruppo multidisciplinare di esperti in CVBDs provenienti da tutto il mondo che si riunisce annualmente, ha formulato una serie di raccomandazioni per gestione delle CVBDs: (1) la prevenzione della trasmissione è il miglior metodo di gestione di queste malattie, mediante l'utilizzo preventivo di insetticidi/repellenti nei confronti dei vettori coinvolti (per impedire il morso) o l'esecuzione di una chemiopprofilassi contro i patogeni o i loro vettori ectoparassiti, il più possibile ad ampio spettro e anche nelle aree tradizionalmente non endemiche a causa dei mutamenti nella distribuzione geo-climatica dei vettori; (2) i flebotomi sono gli unici vettori comprovati di *L.infantum*, tuttavia nelle aree non endemiche l'organismo può essere

trasmissione anche in altri modi (trasmissione verticale madre-feto, trasmissione venerea o trasfusione di sangue infetto), pertanto la leishmaniosi dovrebbe essere sempre tenuta in considerazione (anche nelle aree tradizionalmente non endemiche) nel caso in cui sia possibile una trasmissione non vettoriale da un cane infetto;(3) particolare attenzione dovrebbe essere posta sulla salute dei cani che hanno viaggiato o sono stati introdotti da altri territori o sono in contatto con cani viaggiatori, in quanto questi soggetti sono a rischio e rappresentano un potenziale problema per la salute degli animali locali ;(4) la diagnosi delle CVBDs è molto complessa, principalmente per l'assenza di segni e anomalie clinico-patologiche specifiche, manifestazioni molto variabili ,molti casi di infezione asintomatica e possibilità non rara di co-infezione, pertanto nel selezionare le procedure diagnostiche è necessario combinare più test al fine di escludere in modo certo la presenza di infezioni/co-infezioni;(5) dopo la diagnosi il trattamento delle CVBDs è piuttosto difficile a causa della mancanza di un trattamento specifico, ma soprattutto della difficoltà di ottenere la completa eliminazione del patogeno anche con il raggiungimento della guarigione clinica. A risultato di ciò i cani trattati rimangono reservoirs della patologia per tutti gli animali che vi entrano a contatto, e quindi dovrebbero essere trattati con sostanze preventive per minimizzare il rischio di trasmissione (Baneth, et al., 2012).

3.11 ELEMENTI EPIDEMIOLOGICI LEGATI ALLE CVBDs

Le cause dell'espansione di numerose CVBDs nel mondo e in Europa risiedono dunque in cambiamenti dell'ecologia dei loro vettori, provocati da alterazioni di clima e ambiente, introduzione/reintroduzione dei vettori competenti in aree precedentemente non interessate, veicolazione involontaria degli agenti patogeni mediante dinamismi delle popolazioni umane e i viaggi-spostamenti di animali infetti in modo non manifesto (sia animali di proprietà, randagi o animali selvatici) da aree endemiche ad altre non endemiche. Tutti questi fattori nel loro complesso influenzano l'insorgenza e la diffusione di tali patologie perché contribuiscono alla diffusione dei loro vettori, alcuni dei quali possono essere biologicamente attivi e presenti tutto l'anno come zecche, pulci e la zanzara tigre (Manila,et al., 1998; Rinaldi,et al., 2007; Romi,et al., 2008; Otranto,et al., 2010; Testini, et al.,2010).

La situazione epidemiologica di ogni area dovrebbe essere continuamente monitorata perché estremamente dinamica, inoltre potrebbero essere individuati nuovi organismi e altri, precedentemente riconosciuti, potrebbero essere rinominati (Otranto, et al., 2010).

L'Italia è un paese ad alta prevalenza di CVBDs; la loro distribuzione geografica è fortemente influenzata dalla distribuzione e dalla densità dei vari vettori artropodi, a loro volta strettamente dipendenti dalle condizioni ambientali, in termini di temperatura e umidità, delle varie zone del paese. Per molto tempo le CVBDs sono state strettamente associate alla stagionalità nelle aree temperate e al ruolo del clima e dei fattori ambientali sugli artropodi; al giorno d'oggi il fattore stagionalità non viene più ritenuto valido per numerose CVBDs nel bacino del Mediterraneo. E'infatti evidente come i cambiamenti climatici e micro-ambientali abbiano un impatto significativo su distribuzione, velocità di trasmissione e prevalenza di numerose CVBDs. Nel Mediterraneo e in particolare in Italia, mentre alcuni vettori hanno mantenuto tipica attività stagionale, molti altri sono diventati presenti e attivi tutto l'anno, come ad es. *R.sanguineus* grazie alla sua elevata adattabilità pertanto ,allo stato attuale, i cani devono essere considerati permanentemente a rischio di infezione per determinati patogeni (Rogers, et al., 2006; Rinaldi,et al., 2007; Romi, et al., 2008; Maroli, et al., 2008 ; Otranto, et al., 2009 ,2010)

Attualmente in Italia alcune CVBDs come Anaplasmosi, Ehrlichiosi, Babesiosi, Dirofilariosi e Leishmaniosi mostrano una prevalenza piuttosto elevata e ormai è stata dimostrata l'invasione da parte dei patogeni e dei loro vettori di nuove aree geografiche precedentemente esenti ; ad es. negli ultimi anni sono stati identificati primi focolai di Leishmaniosi canina nel Nord del paese, malattia che, fino a 20 anni fa, veniva considerata esclusivamente una malattia importata dalle aree endemiche del Sud (Maroli, et al., 2008 ;Otranto, et al., 2009;Testini, et al., 2010; Vascellari, et al., 2016).



Figura 3.1 Distribuzione attuale di *Leishmania infantum* in Italia prima e dopo il 1989 (Otranto,2009)

Legenda :

▲ = foci di Leishmaniosi canina fino al 1990 nelle regioni centrali e meridionali dell'Italia (nessun caso autoctono al Nord).

▲ = nuovi casi in aree non endemiche dal 1990 al 2009 sulla base della registrazione di soggetti autoctoni infetti e concomitante presenza dei vettori competenti

Un altro aspetto molto importante alla base dell'endemicità di numerose CVBDs nel nostro paese è l'elevata quantità di cani randagi in aree urbane e rurali. Gli animali che vivono nei canili pubblici italiani hanno rischio elevato di contrarre malattie trasmesse da vettori, principalmente perché nella maggior parte dei casi non sono trattati contro gli ectoparassiti, inoltre si trovano in condizioni piuttosto precarie che li rendono maggiormente suscettibili all'infezione; una volta infetti non vengono né monitorati né trattati (Slater, et al., 2008; Otranto, et al., 2010).

In realtà uno studio realizzato nelle regioni del Nord-Est italiano ha dimostrato che, in relazione ai cani randagi/nei canili, anche i cani di proprietà sono considerevolmente esposti alle CVBDs nonostante l'impiego regolare di antiparassitari e repellenti nei confronti dei principali vettori, molto probabilmente per utilizzo in realtà limitato o incompleto. Ciò evidenzia la necessità di migliorare l'educazione dei proprietari circa l'uso dei prodotti repellenti, al fine di prevenire i morsi dei vettori artropodi e, conseguentemente, la trasmissione delle CVBDs (Vascellari, et al., 2016).

I cani viaggiatori tra l'Italia e aree endemiche per le CVBDs rappresentano un ulteriore fattore di rischio per l'introduzione e diffusione nel nostro paese di patologie esotiche: uno studio recente ha dimostrato che il 62% dei cani infettati da *Babesia canis* ha nell'anamnesi un viaggio nell'Est Europa, dove sia il patogeno che il suo vettore (zecca) sono endemici (Solano-Gallego, et al., 2009; Otranto, et al., 2010 ; Vascellari, et al., 2016).

In uno studio recente sono stati indicati i patogeni trasmessi dai principali vettori che possono infettare i cani presenti in Italia (Otranto, et al., 2010):

Patogeno	Vettore/i	Distribuzione geografica
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ixodes Ricinus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (?)	C, Sardegna
<i>Anaplasma platys</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (?)	C,S
<i>Babesia canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i> (?) <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (?)	C,N
<i>Babesia vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (?)	C, S, N
<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (?)	S
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (?)	Sardegna

<i>Bartonella vinsonii berkhoffii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (?)	S
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Ixodes Ricinus</i>	C,N,S
<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Anopheles maculipennis</i> , <i>Aedes albopictus</i> , <i>A. cinereus</i> , <i>A. geniculatus</i> , <i>A. detritus</i> , <i>A. punctor</i> , <i>Coquillettidia richiardii</i> , <i>Culex modestus</i> , <i>C. pipiens</i> , <i>C. torrentium</i>	C, N,S
<i>Dirofilaria repens</i>	<i>A. albopictus</i> , <i>A. maculipennis</i> , <i>C. pipiens</i>	C,N,S
<i>Acanthocheilonema grassii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	S
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	S
<i>Dipylidium caninum</i>	<i>Ctenocephalides canis – felis</i>	C,N,S
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	C,N,S, Sardegna
<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	C,N,S
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. perfiliewi</i> , <i>P. tobbi</i> (?)	C,N,S
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	S
<i>Thelazia callipaeda</i>	<i>Phortica variegata</i>	S,N

Tabella 3.1 Patogeni del cane trasmessi da vettori presenti in Italia (Otranto, Dantas -Torres, 2010)

Legenda

C= Centro Italia

N = Nord Italia

S = Sud Italia

(?) = vettore sospetto per i cani

La distribuzione geografica si riferisce alla rilevazione del patogeno nei cani o nei vettori.

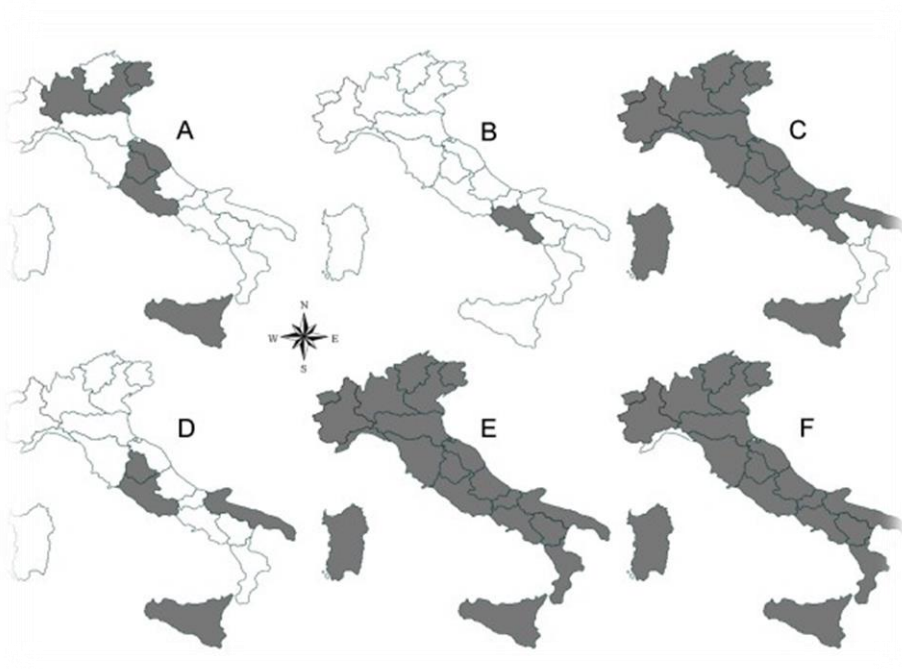


Figura 3.2 Distribuzione dei principali Protozoi trasmessi da vettori e di Dirofilaria immitis nel cane in Italia - Distribution of major vector-borne Protozoa and of Dirofilaria immitis infecting dogs in Italy (Otranto, et al., 2010)

A, Babesia canis; B, Babesia gibsoni; C, Babesia vogeli; D, hepatozoon canis; E, Leishmania infantum ; F, Dirofilaria immitis

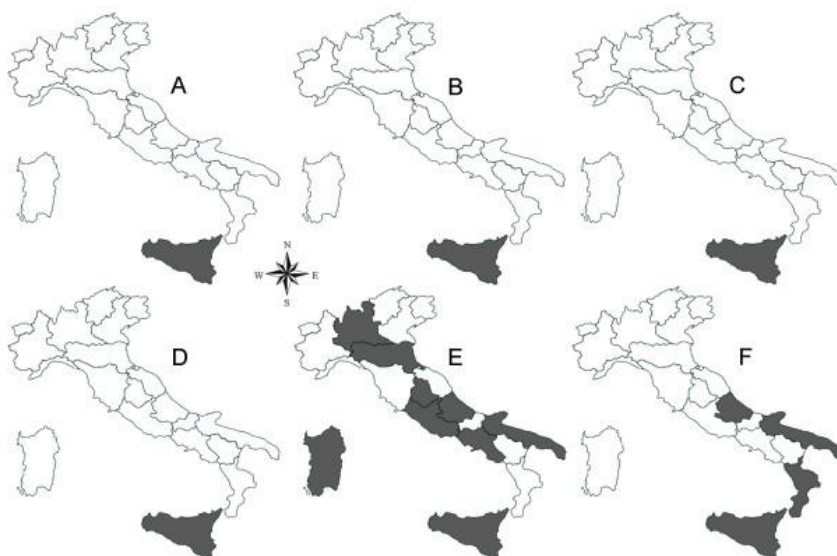


Figura 3.3 - Distribuzione dei principali agenti batterici infettanti il cane in Italia - Distribution of major vector - borne bacteria infecting dogs in Italy (Otranto, et al., 2010).

A, Anaplasma phagocytophilum; B, Anaplasma platys; C, Borrelia burgdorferi; D, Coxiella burnetii; E, Ehrlichia canis ;F, Rickettsia conorii

L'insorgenza delle CVBDs in una determinata zona è direttamente legata alla presenza degli ospiti reservoir e alla densità dei vettori: infatti la probabilità di infezione in una determinata area è ampiamente influenzata dalla densità della popolazione del vettore, maggiore è il contatto tra vettore e ospite e maggiore è il rischio di infezione. (Otranto, et al., 2010; Vascellari, et al., 2016).

Tuttavia sono stati registrati casi di CVBDs anche in alcune zone in cui non è stata rilevata la presenza del vettore, questo sicuramente è riconducibile più ad una mancanza di studi a riguardo piuttosto che all'effettiva assenza di vettori in quella zona (Otranto, et al., 2010). Numerosi agenti infettivi trasmessi da vettori in Italia sono zoonotici e rappresentano un importante problema per la salute pubblica, tra cui *A. phagocytophilum*, *D.immitis – repens* e *L.infantum*; nella maggior parte dei casi i cani infetti con poche probabilità ricoprono il ruolo principale di ospiti reservoir, anzi quasi mai per quanto riguarda la maggior parte delle patologie, fatta eccezione per la leishmaniosi o la dirofilariosi, in cui invece sono il fomite principale. Considerata la rilevanza zoonotica di gran parte delle CVBDs in Italia, il controllo di tali patologie dovrebbe essere un problema della sanità non solo veterinaria ma anche pubblica (Ferroglio, et al., 2006; Maroli, et al., 2008; Maresca,et al., 2009; Otranto, et al., 2010).

Il controllo di queste patologie richiede un approccio olistico che tiene conto della distribuzione e dell'ecologia dei vettori e dei patogeni trasmissibili e il progredire dell'infezione negli animali. I punti principali su cui si basa sono : lotta agli ectoparassiti mediante l'impiego di sostanze acaricide/insetticide sotto varie formulazioni, ad effetto sinergico su animali e ambiente circostante, in genere long -acting e sicure per animali uomo e ambiente ; somministrazione di farmaci a scopo profilattico (ad es. la somministrazione di ivermectina a scopo profilattico contri il terzo e quarto stadio larvale di *Dirofilaria*) e infine la vaccinazione (Otranto, et al., 2008, 2009 , 2010).

3.12 PRINCIPALI VETTORI COMPETENTI DI CVBDs

Rhipicephalus sanguineus

Tra i vari artropodi parassiti del cane in Italia sicuramente le zecche rappresentano i principali vettori di patogeni, in quanto ampiamente distribuite su tutto il territorio grazie all'elevata adattabilità ai vari microambienti, presenti e attive durante tutto l'anno, portatori di una grande varietà di agenti infettanti. *Rhipicephalus sanguineus* o zecca bruna del cane (sottordine Ixodidi) è la specie di zecca infestante il cane più comune e diffusa nel mondo, e ricopre un ruolo di spicco nella diffusione delle CVBDS in quanto vettore principale di

numerosi patogeni (*B.vogeli*, *Ehrlichia canis*, *H. canis*) e presunto vettore di altri (tra cui *B.canis*, *A. platys* e *phagocytophilum*). Alcuni di questi patogeni (ad. es. *E.canis*) vengono trasmessi transtadialmente allo stadio di sviluppo successivo (dalle larve alle ninfe o dalle ninfe agli adulti); oltre a ciò altri agenti patogeni possono persistere per varie generazioni mediante la trasmissione transovarica. Tale aspetto è molto importante perché dimostra che in questo caso non solo gli adulti e le ninfe ma anche le larve possono essere coinvolte nella trasmissione dell'infezione (Bremer, et al., 2005; Socolovschi, et al., 2009 ; Otranto, et al., 2010).

Negli ultimi anni è stato delineato un ruolo della zecca *R. sanguineus* nella trasmissione di *L.infantum* : uno studio sperimentale ha dimostrato che la zecca può agire da vettore meccanico di *L.infantum* qualora vengano ingerite dall'ospite. A conferma di ciò diverse indagini, anche molto recenti, hanno evidenziato la presenza del DNA dei kinetoplasti di *L.infantum* nelle ghiandole salivari di zecche *R.sanguineus* prelevate da soggetti infestati. Questo elemento ha una notevole importanza perché apre nuove prospettive sul controllo della leishmaniosi nelle aree endemiche in cui non è stato ancora identificato il vettore principale (Coutinho, et al., 2005; Dantas-Torres, et al., 2008; Dantas-Torres, et al., 2010; Otranto, et al., 2010).

Diversi lavori hanno inoltre dimostrato, mediante analisi PCR, il naturale passaggio transtadiale e transovarico del kDNA di *L.infantum* nelle zecche *R.sanguineus* (Dabaghmanesh, et al., 2016)

Questa zecca è un parassita endofilo (adattato alla vita interna), monotropico (tutti gli stadi di sviluppo si nutrono su ospiti della stessa specie) e con un ciclo vitale a tre ospiti (ogni stadio evolutivo necessita di un nuovo ospite). In quanto monotropica interessa principalmente il cane ma in realtà, occasionalmente, può parassitare anche altri ospiti che non appartengono alla sua “naturale catena trofica”, tra cui canidi selvatici, gatti, piccoli roditori, uccelli e anche l'uomo; questo suggerisce che si tratta di un parassita tendenzialmente universale capace di adottare diverse strategie per la sopravvivenza, in caso di necessità. In genere il parassitismo di ospiti diversi dal cane è prevalentemente associato alla presenza di cani e ambienti massicciamente infestati (Walker,et al., 2000; Otranto, et al., 2005 ; Cassini,et al., 2009 ; Dantas – Torres, et al., 2010).

L'aspetto più importante è legato al fatto che i canidi selvatici liberi possono essere coinvolti nel mantenimento e nella dispersione del parassita sul territorio, e questo può avere implicazioni importanti nel controllo di queste zecche e nell'epidemiologia delle

patologie da esse trasmesse, in particolare nelle zone di stretto contatto con i cani domestici (Dantas – Torres,et al., 2010).

R. sanguineus si può ritrovare sia in ambiente rurale che urbano,in quanto perfettamente adattata a vivere a contatto con l'uomo e all'interno delle abitazioni umane oltre che a colonizzare gli spazi circostanti come giardini e canili, ed è attiva per tutto l'anno non solo nelle regioni tropicali e subtropicali ma anche in quelle temperate (Dantas- Torres,et al., 2008 e 2010).

A causa del riscaldamento globale e dell'aumento delle temperature medie a livello globale, oltre che degli spostamenti animali,la zecca *R.sanguineus* si sta estendendo verso il Nord Europa dalle originarie regioni mediterranee, e attualmente è stata rilevata in zone precedentemente esenti come Francia, Germania, Belgio e Paesi Bassi (Beugnet, et al., 2009).

Studi recenti hanno dimostrato che l'aumento delle temperature incrementa la possibilità di infestazione degli ospiti non convenzionali come conigli e l'uomo, pertanto il rischio zoonosi legato al parassitismo di questa zecca è potenzialmente maggiore in quelle zone sottoposte ad estati più lunghe/più calde del normale (Dantas- Torres,et al., 2008 e 2010).

La prevalenza e l'intensità media di infestazione da parte di *R. Sanguineus* nel cane (in Italia stimata intorno al 39,4%) può variare ampiamente secondo una serie di fattori geografici, stagionali ed ecologici legati alla specie ospite, sia a livello di popolazione (ad es densità della popolazione canina o la percentuale di soggetti trattati con ectoparassitici/repellenti) che di individuo (razza, età, sesso e stile di vita) (Otranto, et al., 2005; Dantas-Torres,et al., 2010). Ad esempio uno studio recente ha evidenziato che le infestazioni maggior avvengono in concomitanza delle stagioni secche (Silveira, et al., 2009 ; Dantas-Torres, et al., 2010.) ; diverse esperienze hanno evidenziato che le infestazioni tendono ad essere più importanti nei soggetti giovani rispetto agli anziani e nei maschi rispetto alle femmine (anche se non è stato chiarito se si tratti di una vera e propria diversa suscettibilità legata al genere) (Silveria,et al., 2009 ; Tinoco –Gracia,et al., 2009 ; Dantas –Torres, et al., 2009 e 2010).

Alcune razze, ad es. il Cocker Spaniel Inglese, sono apparentemente più suscettibili rispetto al altre (Louly, et al., 2009; Dantas – Torres, et al., 2010); uno studio più recente ha suggerito che questa zecca può mettere in atto distinti pattern comportamentali a seguito dell'esposizione all'odore di diverse razze (Louly, et al., 2010; Dantas – Torres, et al., 2010). *R.sanguineus* può attaccarsi dovunque sul cane, ma i siti di attacco preferenziali sono testa (soprattutto orecchie) spazi interdigitali, dorso, regione inguinale e ascelle ; una volta sul

cane penetra la cute dell'ospite con i suoi cheliceri e introduce nello spessore (rimanendo tendenzialmente più superficiale rispetto ad altre specie di zecche) cheliceri e ipostoma, lacera capillari e piccoli vasi cutanei limitrofi al punto di attacco creando un "bacino" di nutrimento da cui succhiare sangue e altri liquidi; la trasmissione dei patogeni di cui questa zecca è vettore in genere avviene dopo 24-72 ore dall'inizio dell'infestazione (Dantas – Torres, et al., 2010).



Figura 3.4 *Rhipicephalus sanguineus* (labs.russel.wisc.edu, Department of Entomology, University of Wisconsin-Madison)

Anche altre specie di zecche sono state isolate su cani in diverse regioni italiane anche se il loro ruolo vettoriale ancora deve essere chiarito; nonostante *R. sanguineus* sia la specie più comune in tutto il territorio italiano, nelle regioni del Nord-Est è stata isolata con maggior frequenza la zecca *Ixodes ricinus*, vettore di numerosi patogeni come *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* e *B. spp* (Cassini, 2009 et al., ; Vascellari, et al., 2016)

A dimostrazione di ciò la comparazione di studi eseguiti sul Nord, il Centro e il Sud del Paese circa la diversa sieroprevalenza per le varie CVBDs ha evidenziato che nelle regioni del Nord, e in particolare del Nord- Est, vi è una bassa sieroprevalenza di *Ehrlichia* e *Babesia* (contro rispettivamente il 46% e il 70% del centro-sud) , ovvero i principali patogeni trasmessi dalla zecca *R.sanguineus*, meno diffusa a causa delle differenze climatiche : le temperature più elevate e il clima in generale più mite durante tutto l'anno tipici dell'Italia Centro-Meridionale contribuiscono alla sua diffusione (Pennisi, et al., 2012 ; Gray, et al., 2013 ; Ebani, et al., 2014 ; Vascellari, et al, 2016).

Ixodes Ricinus

Ixodes ricinus o Zecca del bosco (Classe Arachnida; Ordine Parasitiformes; Sottordine Ixodida Metastigmata; Famiglia Ixodidae) è una zecca dura, parassita principalmente dei ruminanti ma può alimentarsi anche su altri mammiferi come il cane e l'uomo (Taylor, 2010).

Ixodes ricinus è il principale vettore di *A. phagocytophilum*, *B. Burgdorferi* sensu latu, è stato ipotizzato un suo ruolo di possibile vettore anche di *B.vogeli* nel Centro-Nord Italia (Cassini, et al., 2009; Otranto,et al., 2010).

Questa zecca è diffusa soprattutto in Europa Occidentale (ad eccezione del Bacino del Mediterraneo, se non nelle zone di altitudine), Asia Centrale, alcune aree dell’Nord-Africa e dell’Australia, in particolare nei microhabitat umidi e a temperatura mite (10-30°C e >80% umidità) di boschi, foreste, brughiere e pascoli. Sebbene sia stata rinvenuta in Nord America in questo continente non si è mai insediata stabilmente (Parola,et al.,2005; Beugnet, et al., 2009; Taylor, 2010). In Europa, come altre specie di zecche, *I.ricinus* si sta espandendo negli ultimi anni in zone prima libere, probabilmente a conseguenza dei cambiamenti climatici ed ecologici e di fattori antropologici e grazie anche alla bassa specificità di ospite e alla grande tolleranza ambientale (Materna,et al.,2005; Jore, et al., 2011,2014; Jaenson, et al., 2012; Medlock, et al., 2013; Dugat,et al., 2016).

Per quanto riguarda le caratteristiche morfologiche la femmina, quando è ingorgata, ha una forma a fagiolo con gli arti non più visibili ed è di colore grigio chiaro, i maschi sono simili ma di dimensioni ridotte e inoltre mantengono sempre visibili i quattro arti in quanto assumono pasti di sangue di minore entità rispetto alle femmine (Beugnet,et al., 2009).

I.ricinus è una zecca a tre ospiti con un ciclo vitale che può durare fino a tre anni. L'accoppiamento avviene sull'ospite, la femmina viene fecondata una volta sola ed effettua un singolo ma abbondante pasto di sangue della durata di circa 14 giorni, dopodiché si lascia cadere a terra per deporre migliaia di uova in un luogo riparato e muore. Dalle uova schiudono le larve che iniziano a ricercare un ospite dopo un periodo che va da qualche giorno a qualche settimana dalla schiusa in base alle condizioni di temperatura e umidità. Le larve si arrampicano sugli steli delle piante per riuscire ad attaccarsi alla superficie corporea di un ospite di passaggio; una volta sull'ospite si alimentano per 3-5 e aumentano il loro peso corporeo di 10-20 volte, cadono a terra per digerire il pasto di sangue ed effettuare la muta in ninfe. Le ninfe, l'anno successivo, salgono su un nuovo ospite e si nutrono per 3-5 giorni per poi cadere nuovamente a terra ed effettuare la muta in adulti; solitamente l'ospite scelto dalle ninfe è più grande di quello delle larve ed è rappresentato ad esempio da un uccello, un coniglio o uno scoiattolo. Gli adulti infine salgono sul terzo

ospite, di dimensioni ancora maggiori, per effettuare il pasto di sangue e accoppiarsi. A differenza delle femmine, i maschi si alimentano in modo intermittente e si accoppiano ripetutamente. La durata della sopravvivenza dei vari stadi nell'ambiente dipende da temperatura e umidità (Parola, et al., 2005 ; Taylor, et al., 2010).

Le zecche appartenenti alla specie *Ixodes* sono telotrope perché in grado di nutrirsi un'ampia varietà di ospiti, e ancora oggi non sono state individuate le sue preferenze (Stanek, et al., 2009; Dugat, et al., 2016); è stato sottolineato che le larve preferenzialmente parassitano piccoli animali (ad es. roditori), le ninfe parassitano animali più grandi (ad es. un coniglio) e infine gli adulti vanno a nutrirsi su grandi animali (Chauvet, et al., 2004; Sonenshine, et al., 2014; Dugat, et al., 2016).

Tutti gli stadi in genere sono attivi, nel Vecchio Continente, tra Aprile e Giugno e durante l'inverno; durante l'estate solamente gli stadi immaturi sono attivi, mentre gli adulti entrano in una fase di diapausa fino all'autunno (Parola,et al., 2005)



Figura 3.6 Femmina *Ixodes Ricinus* (www.influentialpains.com)



Figura 3.7 Femmina di *Ixodes Ricinus* ingorgata (www. theguardian.com)

Dermacentor reticulatus

Dermacentor reticulatus (Classe Arachnida, Ordine Parasitiformes, Sottordine Ixodida Metastigmata, Famiglia Ixodidae) è una zecca che infesta diverse specie animali come bovini, ovini, equini, suini, cane e uomo, le larve invece si alimentano sulla superficie di mammiferi più piccoli come insettivori e, occasionalmente, uccelli. E' diffusa in tutta l'Europa (dalla costa atlantica sino al Kazakistan) e Africa Occidentale .

Morfologicamente è una zecca ornata con occhi e festoni, di colore bianco con variegature marroni in entrambi i sessi (Taylor,2010).



Figura 3.8 Adulto di *Dermacentor reticulatus* (www.dartmoorcarn.uk)

D. reticulatus è una zecca a tre ospiti che, a seconda delle condizioni climatico -ambientali, può completare il suo ciclo biologico in 1-2 anni. Ciascuno stadio di sviluppo si alimenta una volta sola sull'ospite, poi si lasciano cadere dalla superficie corporea dell'ospite, mutano nell'ambiente e cercano un nuovo ospite. L'accoppiamento degli adulti avviene sull'ospite, una volta fecondata le femmine si nutrono di sangue per 9-15 giorni prima di cadere, deporre un numero elevato di uova in luoghi riparati e morire; l'ovodeposizione può durare 60-40 giorni in base ai valori di temperatura e umidità dell'ambiente. Le larve si schiudono dalle uova dopo 2-3 settimane, salgono su un ospite e si alimentano per circa 2 giorni, poi cadono e mutano in ninfe nell'ambiente. Allo stesso modo le ninfe salgono su un altro ospite e si alimentano per diversi giorni, poi cadono e diventano adulti (Taylor, 2010).

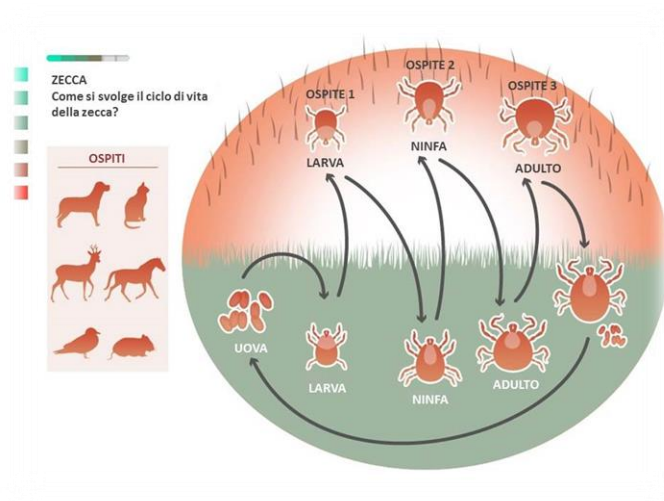


Figura 3.9 ciclo biologico delle zecche a 3 ospiti (www.fleatickrisk.com)

L'entità e la distribuzione della popolazione di alcune specie di zecche, e la conseguente prevalenza delle patologie da esse trasmesse sono aumentate considerevolmente in Europa nell'ultimo decennio. Pertanto si è sentita l'esigenza di sviluppare un modello per lo studio epidemiologico fondato su tre elementi chiave: modello biomatematico per studiare la dinamica di vettori e patogeni, mappatura satellitare per determinare insorgenza e distribuzione delle malattie in relazione alla vegetazione e alle attività umane, infine un modello climatico per seguire l'attività dei vettori in relazione all'andamento delle condizioni metereologiche (Rinaldi, et al., 2006; Marechal, et al., 2008 ; Beugnet, et al., 2009).

Inoltre l'istituzione di un simile modello può contribuire a identificare il metodo migliore per il controllo delle malattie trasmesse da zecche permettendo di valutare l'impatto delle diverse misure prese (Otranto, et al., 2008).

Recentemente è stato elaborato e presentato un nuovo modello "FleaTickRisk che può prevedere, su base settimanale, l'attività di tre specie di zecche, pulci, zanzare e flebotomi in tutta Europa, l'entità delle popolazioni di questi vettori e il rischio di trasmissione delle patologie ad essi collegati. I dati parassitologici e climatici sono strettamente legati tra loro, in quanto il clima gioca un ruolo fondamentale nella biologia e ecologia dei vettori, e l'epidemiologia ne deriva direttamente. L'obiettivo principale di questo modello è studiare l'impatto dei cambiamenti climatici sulla carica parassitaria delle varie zone, ma anche aiutare i veterinari nella loro attività routinaria di raccomandazione dei trattamenti antiparassitari più idonei (Beugnet, et al., 2008,2009 ; www.fleatickrisk.com).

Sul sito è presente una mappa geografica e satellitare dell'europa che, giornalmente, esprime la diversa densità territoriale dei vari vettori secondo una scala colorimetrica: verde (densità molto bassa 0 -20), giallo (densità bassa 20-40) , arancio (densità media 40-60) , ocra (densità alta 60 -80), rosso (densità molto alta 80-120). L'indice di densità della popolazione, chiamato anche indice cumulativo di attività, indica le dimensioni della popolazione di parassiti e quindi se i parassiti sono o non sono numerosi; è calcolato prendendo in considerazione le condizioni meteorologiche delle 6 settimane precedenti.



Figura 4 fleatrickrisk (www.fleatrickrisk.com)

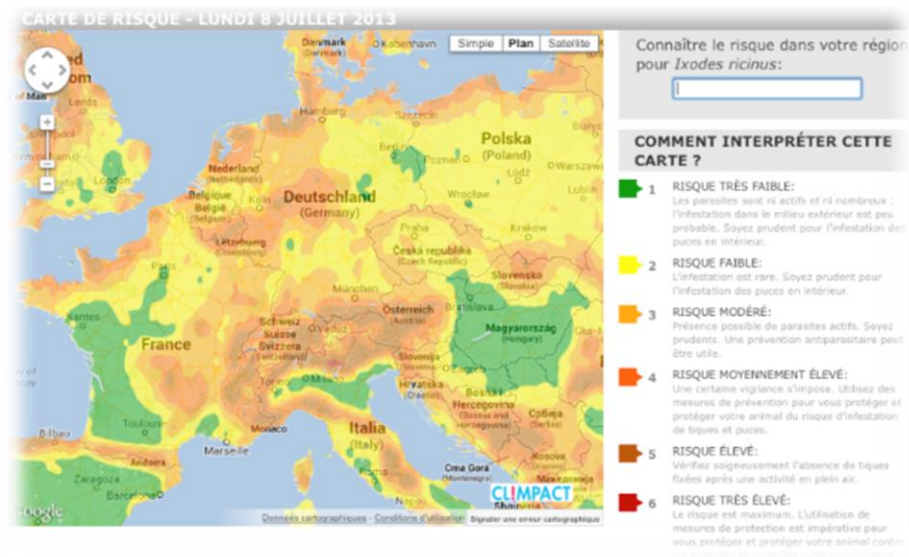


Figura 4.1 Mappa del rischio e legenda (www.reseauborreliose.fr)

Flebotomi

I flebotomi (Diptera, Psychodidae), in particolare le specie *Phlebotomus perniciosus* e *Ph. Neglectus*, sono gli unici insetti ematofagi riconosciuti come vettori del protozoo *L. infantum*, patogeno zoonotico di grande rilevanza. La trasmissione avviene mediante il morso delle femmine ematofaghe che hanno precedentemente morso un soggetto infetto. Sono state registrate molto più raramente altre fonti di infezione, tra cui la trasfusione di sangue infetto (Maroli, et al., 2008; Otranto, et al., 2010; Vascellari, et al., 2016 ; Alten, et al., 2016).

Al giorno d'oggi sono riconosciute più di 800 specie in differenti regioni del mondo, raggruppate nel sottordine *Nematocera*, ordine *Dipteri*, famiglia *Psychodidae*, sottofamiglia *Phlebotominae*, tra queste solo 98 specie sono dimostrate o sospette vettori di leishmaniosi (Maroli, et al., 2013).

I flebotomi completano la loro metamorfosi in 4 stadi di sviluppo: uova, 4 stadi larvali, pupa e adulto ; gli stadi immaturi, a differenza delle zanzare, non richiedono acqua stagnante ma principalmente un ambiente caldo umido (Maroli, et al., 2013).

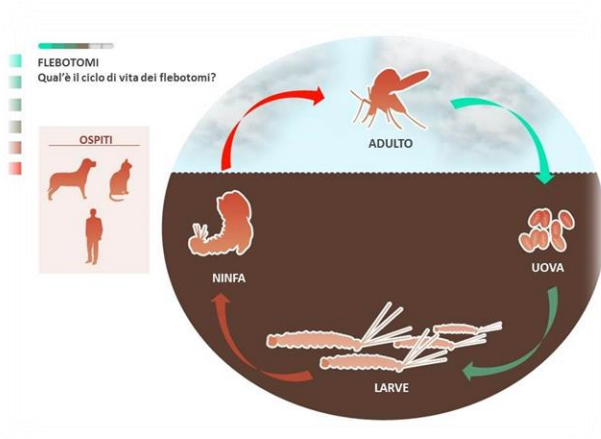


Figura 4.2 Ciclo vitale dei flebotomi (www.fleatickrisk.com)

Gli adulti sono piccoli, coperti da abbondante peluria, hanno zampe molto lunghe e sottili, e tengono le ali nella caratteristica posizione a “V” sul dorso a riposo. Sia i maschi che le femmine normalmente si nutrono delle secrezioni zuccherine prodotte dalle piante o di melata, tuttavia le femmine necessitano di almeno un pasto di sangue per poter completare lo sviluppo delle uova. I siti di riposo degli adulti sono spesso vicini ai siti di riproduzione larvali, consistenti in micro-habitat umidi, freschi e bui (Maroli, et al., 2013).



Figura 4.3 Femmina adulta *P. perniciosus* (star.evodexevo.eu)

I flebotomi normalmente li ritrovano nelle zone calde di Asia, Africa, Australia, Sud Europa e Centro-Sud America; gli effetti dei cambiamenti climatici a lungo termine sull'espansione geografica dei vettori di *L. infantum* dal Mediterraneo verso latitudini più settentrionali o maggiori altitudini sono stati previsti già da tempo; a conferma di ciò negli ultimi anni è stato registrato un incremento sia in termini di densità di popolazione che di estensione geografica dei flebotomi e, conseguentemente del patogeno, in zone un tempo esenti come il Nord Italia, Francia, Regione dei Pirenei e la regione della Renania –Palatinato in

Germania (questo viene considerato un importante fattore predittivo sulla diffusione dei flebotomi verso il Nord-9 (Maroli, et al., 2008,2013 ; Otranto, et al., 2009 ,2010 ; Testini, et al., 2010 ; Vascellari, et al., 2016 ; Alten, et al.,2016)

In realtà la diffusione dei flebotomi e l'aumentata densità delle loro popolazioni sono fortemente influenzate anche dall'incremento dei siti di riproduzione e delle fonti di sangue come nutrimento, oltre che dall'interruzione delle attività di controllo dei vettori in un contesto di migrazioni e spostamenti delle popolazioni umane e animali, deforestazioni, urbanizzazione e conflitti (Fisher, et al., 2011; Colwell,et al., 2011; Maroli, et al., 2013).

L'attività dei flebotomi adulti nel Mediterraneo è tipicamente stagionale : uno studio recente sulla fenologia dei flebotomi nel Bacino del Mediterraneo ha dimostrato una tipica dinamica stagionale, con il maggior rischio potenziale di trasmissione di *L.infantum* localizzato nell'arco temporale tra Giugno e Ottobre, anche se questo rischio non è omogeneamente distribuito per tutta l'area considerata, in quanto nelle regioni più a sud si hanno più precoci e frequenti ondate di densità dei vettori adulti. E' stata dimostrata una significativa correlazione tra il periodo di comparsa degli adulti (primi di Aprile – prima metà Giugno) e il trend della loro densità e la latitudine - temperatura media delle varie zone considerate ; le stesse specie di flebotomi appaiono più precocemente alle latitudini inferiori e più tardivamente a quelle superiori (ad esempio *P.perniciosus* è comparso in diversi periodi di Maggio in Spagna e Portogallo, a Giugno inoltrato invece in Italia). Contrariamente il periodo di scomparsa degli adulti non presenta significativo legame con la latitudine o la temperatura media annua e può avvenire in qualsiasi momento nel periodo tra metà Settembre e Novembre; recentemente sono stati raccolti campioni di *P.perniciosus* nella zona di Catania agli inizi di Dicembre (Otranto, et al., 2007,2010; Ferroglio, et al., 2008;Maroli, et al., 2008; Rossi, et al., 2008; Testini, et al., 2010 Lisi,et al.. 2014 ;Alten, et al., 2016) .

Alle latitudini più basse l'attività dei vettori inizia molto precocemente, agli inizi di Aprile e si conclude a Novembre inoltrato. Alle altre latitudini il rischio di potenziale esposizione a *L.infantum* cresce progressivamente a partire dai primi di Maggio, presenta ampio picco tra Luglio e Settembre per poi decadere fino a Ottobre inoltrato. Non vi è apparentemente rischio di trasmissione nel periodo invernale da Dicembre a Marzo (Alten, et al., 2016).

Questi processi possono variare da zona a zona, anche in relazione alle dimensioni della iniziale popolazione larvale / adulta,alle variazioni ambientali locali e anche a parametri indirettamente collegati alla temperatura e meno investigati come il l'orologio biologico

endogeno fotoperiodo-dipendente (Meireles –Filho, et al., 2013 ; Rivas, et al., 2014 ; Alten, et al., 2016).

L'inverno o in generale l'andamento medio complessivo delle temperature possono influenzare la densità relativa degli adulti che compariranno nella successiva primavera/estate, molto probabilmente perché hanno effetto sulla sopravvivenza delle popolazioni larvali in svernamento (Alten, et al., 2016).

La temperatura, inversamente proporzionale alla latitudine, è il principale fattore determinante nell'inizio dell'attività dei flebotomi: l'incremento generalizzato delle temperature nel Mediterraneo durante il passaggio dalla Primavera all'Estate (tra Marzo, Aprile e Maggio) stimola la fuoriuscita degli insetti adulti dalla diapausa sotto forma di stadio larvale L4 in cui entrano durante l'inverno (Volf, et al., 2011 ; Alten, et al., 2016).

I flebotomi, in particolare le femmine ematofaghe, presentano attività notturna determinata dal ritmo circadiano che coordina le attività nutritive, e questo è molto importante per le dinamiche di trasmissione di *L. infantum* (Meireles – Filho, et al., 2013 ; Alten, et al., 2016).

In particolare l'attività nutritiva dei flebotomi aumenta rapidamente dopo il tramonto e si protrae fino a poco dopo l'alba, con il picco tra le 23 e le 2 del mattino (Otranto, et al., 2010; Alten, et al., 2016).

La trasmissione è prevalentemente rurale e si verifica soprattutto intorno alle zone urbane, vicino a case con cortile o giardino dove è possibile il contatto diretto con i cani, e dove sono presenti condizioni che favoriscono l'insediamento di flebotomi, come spazzatura accumulata o decomposizione di materiale organico (Maia, et al., 2015).

Oltre che essere i vettori di *Leishmania* nel suo ciclo vitale, i flebotomi possono essere coinvolti direttamente nella patogenesi della malattia: durante il processo nutritivo sulla cute dell'ospite vertebrato la femmina del flebotomo inietta nel sangue il contenuto delle proprie ghiandole salivari, ricco di sostanze ad azione farmacologica come anticoagulanti, vasodilatatori, fattori antipiastrinici, molecole immunomodulatorie e antinfiammatorie (Andrade, et al., 2007 ; Maroli, et al., 2013).

3.13 PRINCIPALI CVBDs OGGETTO DI SCREENING NEI CANI DONATORI

Anaplasmosi canina o Ehrlichiosi granulocitica canina

L'ehrlichiosi granulocitica canina è una malattia infettiva non contagiosa provocata dall'infezione da *Anaplasma phagocytophilum* (famiglia Anaplasmataceae) α -proteobatterio di forma coccica (pleomorfo) intracellulare obbligato, zoonotico trasmesso dal morso delle zecche dure. (Eberts, et al., 2011; Aureli, et al., 2012; Stuenkel, et al., 2013; Dugat, et al., 2016).

Questo batterio Gram - negativo infetta i granulociti, principalmente neutrofili ma anche eosinofili, al cui interno riesce a sopravvivere e a replicarsi all'interno di vacuoli, formando delle microcolonie definite morule (Carrade, et al., 2009).

Fino al 2001, *A. phagocytophilum* era incluso nel genere Ehrlichia ed era denominato *E. phagocytophila*; tale complex includeva tre specie: *E. phagocytophila*, *E. equi*, HGE agent (agente dell'ehrlichiosi granulocitica umana). Sulla base dell'analisi della sequenza 16s rRNA e degli operoni groES, questi tre agenti sono stati accorpati in un'unica specie, definita *Anaplasma phagocytophilum* (Kirtz, et al., 2005).

Questo batterio, diffuso in tutto il mondo, può infettare diverse specie di mammiferi e determina un quadro patologico con sintomatologia variabile dalla forma subclinica alla forma letale in diversi animali domestici (Aureli, et al., 2012; Stuenkel, et al., 2013; Dugat, et al., 2016).

I cicli epidemiologici di *A. phagocytophilum* sono piuttosto complessi e coinvolgono diversi ecotipi, vettori e ospiti mammiferi (in relazione allo spettro d'ospite della zecca vettore), con una grande variabilità a seconda dell'area geografica considerata, soprattutto per differenze genetiche tra i vari ceppi (Barber, et al., 2013; Dugat, et al., 2016).

La specie *A. phagocytophilum* può essere suddivisa in diverse varianti genetiche probabilmente coinvolte in diversi cicli epidemiologici; le principali sono state definite impiegando la sequenza del locus 16s RNA, Ap-V1 e Ap-ha (Chen, et al., 1994; Carrade, et al., 2009; Dugat, et al., 2016), possono coesistere ed essere trasmesse anche dallo stesso vettore (Dugat, et al., 2016). Questo suggerisce che la loro distribuzione non dipende dall'area geografica quanto dalla presenza o meno degli ospiti vertebrati che possono infettare. Queste varianti sono state isolate e studiate soprattutto negli Stati Uniti ma in

realtà sono state individuate anche in Europa, soprattutto in specie di ruminanti selvatici (Rejmanek, et al.,2012,2013; Moroff, et al.,2014; Dugat,et al.,2016).

I vettori ufficialmente riconosciuti di *A. phagocytophilum* sono le zecche appartenenti al genere *Ixodes*, nello specifico *I. ricinus* in Europa, soprattutto nella parte Centro-Settentrionale (prevalenza di infezione 1-20%); tuttavia il DNA di *A. phagocytophilum* è stato rilevato anche in altri generi e specie di zecche (ad es.*Ixodes hexagonus* o *Ixodes trianguliceps*), pertanto non è ancora stato stabilito definitivamente quali siano i vettori competenti (Bown,et al.,2003,2008,2009; Carrade, et al.,2009; Aureli, et al.,2012; Silaghi,et al.,2012; Stuen, et al.,2013; Sainz,et al.,2015; Dugat, et al.,2016). Oltre a ciò il DNA del batterio è stato ritrovato anche in aree in cui *I. ricinus* è assente o molto rara, per questo si sospetta un coinvolgimento anche di *R. sanguineus* (Moulin,et al., 2009; Chastagner., et al.,2013;Stuen,et al.,2013; Dugat., et al.,2014; Dugat, et al.,2016).

La zecca vettore può infettarsi con *A. phagocytophilum* durante il pasto di sangue su un animale infetto o mediante trasmissione transtadiale (da uno stadio all'altro), mentre non è stata evidenziata la trasmissione transovarica per questa specie. La zecca infetta a sua volta trasmette l'infezione durante il pasto di sangue su un nuovo ospite, in questo caso però solo le ninfe e le femmine adulte possono infettare gli ospiti. (Parola, et al.,2005; Aureli, et al., 2012; Dugat, et al.,2016).

Il tasso di infezione è maggiore negli adulti rispetto alle ninfe, in quanto fanno un pasto di sangue in più e quindi hanno doppia possibilità di contrarre l'infezione. Variazioni di prevalenza sono state osservate anche in relazione all'anno di campionamento e alle differenti zone geografiche (Hildebrandt,et al.,2002;Cao,et al.,2003; Holman,et al.,2004; Ohashi,et al.,2005; Grzeszczuk,et al.,2006;Wielinga, et al.,2006; Silaghi, et al.,2008,2012; Schorn,et al.,2011; Overzier,et al.,2013; Stuen,et al.,2013).

In Europa l'anaplasmosi è stata descritta principalmente nelle regioni del Centro Europa, in funzione della distribuzione geografica della zecca vettore, con una sieroprevalenza stimata, mediante studi epidemiologici tra il 3 e il 57% (possibile sovrastima legata alle diverse popolazioni testate e ai diversi test impiegati, oltre che a fenomeni di cross-reattività sierologica con altre specie batteriche) (Sainz,et al.,2015).

In Italia l'infezione da *Anaplasma* negli animali è stata riportata in una varietà di animali inclusi cavalli, bovini, porcospini, pecore, cani, gatti, daini, volpi e topi (Ebani,et al.,2008,2011; Torina,et al.,2008,2010; Otranto,et al.,2010; Passamonti,et al.,2010; Aureli, et al.,2012); vi sono numerose evidenze sierologiche e molecolari della sua presenza, in animali selvatici come cervi, daini o volpi, nel Centro Italia (Ebani,et al.,2008,2011). Il

capriolo ha un potenziale ruolo di ospite reservoir nel Nord-Est dell'Italia (Aureli,et al.,2012); studi recenti hanno inoltre dimostrato la presenza dell'infezione nel daino e nelle popolazioni di zecche *Ixodes* in una riserva naturale nella regione Emilia – Romagna e nel resto del Nord Italia (Veronesi, et al., 2011; Aureli, et al., 2012).

In un recente studio condotto nel Nord-Est dell'Italia ha rilevato un tasso di prevalenza del 1,5% nelle zecche adulte (Capelli,et al.,2012; Aureli,et al., 2012); in Emilia – Romagna è stata rilevata una prevalenza tra 7,9 e 14,7% (Aureli,et al.,2012).

Variazioni nella prevalenza di *A. phagocytophilum* nelle zecche può essere attribuita a diversi fattori, tra cui: suscettibilità individuale , suscettibilità di determinate popolazioni, competenza vettoriale delle varie specie di zecca ; la trasmissibilità della variante di *A.phagocytiphilum* coinvolta; la suscettibilità a livello di specie- popolazione-individuo degli ospiti mammiferi; presenza di reservoirs competenti. Contribuiscono, naturalmente, anche fattori climatici, ambientali e demografici perché influiscono sulla distribuzione e sulla densità delle popolazioni di zecche e di ospiti (Stuen, et al.,2013).

Per questi motivi e per l'assenza di trasmissione transovarica, *I.ricinus* non è in grado di mantenere in modo persistente *A.phagocytophilum*, e pertanto non può essere considerata come ospite reservoir ; in quanto batterio intracellulare obbligato, *A. phagocytophilum* ha bisogno di ospiti reservoir mammiferi che gli permettano di sopravvivere, soprattutto al di fuori del periodo di attività dei vettori. L'infezione naturale con *A.phagocytophilum* è stata riportata nell'uomo e in un'ampia varietà di animali domestici e selvatici, tra cui pecore, bovini, cavalli, renne, caprioli, cervi, caprioli, alci , cani (Jenkins,et al., 2001; Franzen, et al., 2007; Heine, et al., 2007; Eberts, et al.,2011; Stuen, et al.,2003, 2013). Solamente alcuni possono essere considerati come ospiti reservoir perché in possesso di pre-requisiti necessari: deve essere parassitato da una zecca infetta; deve ricevere una quantità critica di agenti infettanti; deve permettere al patogeno di replicarsi e sopravvivere per il tempo necessario ; deve permettere al patogeno di perpetuare il proprio ciclo mediante nuove zecche (Stuen,et al.,2013).

Numerosi mammiferi sono stati individuati come ospiti reservoir per *A.phagocytophilum* : principalmente ruminanti selvatici in quanto principali ospiti per le zecche infette (maggiore è la densità di questi animali, maggiore è la densità delle zecche e maggiore è la prevalenza di *Anaplasma*); piccoli animali come roditori e insettivori (principali ospiti soprattutto per le ninfe e gli stadi larvali), anche se in Europa la prevalenza di infezione da *A.phagocytophilum* è inferiore rispetto ai ruminanti selvatici. (Alberdi,et al.,2000; Barandika,et al.,2007; Dugan, et al.,2008; Foley,et al.,2008; Ebani,et al.,2008,2011;

Aureli,et al.,2012; Silaghi,et al., 2012; Medlock, et al.,2013; Stuen,et al.,2013; Barakova, et al.,2014; Dugat, et al.,2016).

Gli studi più recenti suggeriscono che : i cervi possono essere ospiti reservoir per le varianti di *A.phagocytophilum* che infettano i ruminanti domestici ; è improbabile che i caprioli siano ospiti reservoir per le varianti umane, equine ,degli animali d'affezione o dei ruminanti domestici, potrebbero essere coinvolti in un altro ciclo epidemiologico e mantenere proprie varianti specifiche, sia patogene che a-patogene; i roditori possono comportarsi da ospiti reservoir in un ciclo epidemiologico indipendente, che include solo i roditori come ospiti mammiferi e ha *I.trianguliceps* come vettore (Bown, et al.,2009; Overzier, et al.,2013; Stuen, et al., 2013;Blaoarova,et al.,2014; Dugat, et al.,2016).

Solo pochi studi hanno indagato il ruolo degli uccelli nei cicli epidemiologici di *A.phagocytophilum*, e hanno sottolineato che la prevalenza di *A.phagocytophilum* nelle zecche che infestano gli uccelli è bassa, pertanto è poco probabile che essi agiscano da ospiti reservoir, forse possono essere coinvolti in un ciclo indipendente; al contrario gli uccelli migratori che coprono grandi distanze possono essere importanti per la diffusione del patogeno e dei suoi vettori. (Skotarczak,et al., et al., 2006; Palomar et al., et al., 2012;Stuen, et al., 2013; Dingler, et al., 2014;Lommano, et a., 2014; Dugat, et al.,2016)

In Europa le pecore sono tra i principali ospiti accidentali di *A.phagocytophilum*, insieme anche ad altri ruminanti domestici, al cavallo, al cane (prevalenza 1-6%) e al gatto(prevalenza <0,5%) e anche all'uomo , tuttavia il loro ruolo come ospiti reservoir è stato messo in discussione . La batteriemia in queste specie, infatti, ha una durata limitata (<28 giorni), pertanto non contribuisce alla diffusione del batterio ad altri soggetti (Carrade,et al.,2009; Stuen, et al.,2013; Dugat,et al.,2016).

Nel cane sono state identificate 5 varianti di *A.phagocytophilum*, anche se non è ancora stato compreso del tutto il grado in cui le variazioni genetiche contribuiscono a far variare la patogenicità di questi ceppi (Carrade,et al.,2009;)

E' stata dimostrata la trasmissione mediante somministrazione intravenosa di sangue intero infetto e sono stati riportati numerosi casi di contaminazione di cani riceventi in diversi paesi in Europa: Svizzera, Italia, Svezia, Regno Unito, Norvegia e Austria (Kirtz,et al.,2005).

Diversi studi hanno dimostrato che l'età media di insorgenza dei soggetti clinicamente affetti si aggira tra i 6 e gli 8 anni (range tra 6 mesi e 14 anni); non sono state individuate particolari predisposizioni di razza o sesso, anche uno studio ha riscontrato un'incidenza

elevata nei Golden Retrievers, probabilmente in funzione della loro predisposizione ad effettuare attività all'aperto (Kohn,et al.,2008; Carrade, et al.,2009).

Uno studio svedese ha inoltre evidenziato una correlazione diretta tra aumento della percentuale di sieropositività e aumento dell'età dei soggetti campionati, riflettendo una maggiore esposizione (Egenvall,et al.,2000; Carrade,et al.,2009).

Il batterio viene trasmesso transtadialmente all'interno della popolazione di zecche e la zecca deve rimanere attaccata all'ospite per 36-48 ore per poterlo trasmettere all'organismo ospite (Carrade, et al.,2009).

Il patogeno può alternare due forme diverse, da cellula piccola a nucleo compatto che si lega alle cellule target dell'ospite a cellula reticolata in grado di moltiplicarsi a nuovamente cellula a nucleo compatto che rilascia la cellula ospite provocandone la lisi (Popov,et al.,2007; Lai,et al.,2009; Carrade,et al.,2009).

Durante il pasto di sangue da parte della zecca vettore diversi componenti presenti nella saliva dell'artropode modulano la risposta infiammatoria mediata dai neutrofili (Beaufays,et al.,2008; Guo, et al.,2009; Heinze, et al.,2012; Stuen,et al.,2013). L'orchestrazione delle interazioni tra vettore-patogeno e i meccanismi difensivi dell'organismo ospite sembra promuovere l'infezione e la trasmissione, piuttosto che controllarla, mediante una maggiore disponibilità delle cellule infette in circolo nel punto del morso della zecca (Choi, et al.,2003,2004; Granquist,etal.,2010; Chen, et al.,2012;Stuen,et al.,2013) .

La ridotta carica batterica circolante tra i periodi di batteriemia può indicare una clearance temporanea delle cellule infette o possibile marginazione dei granulociti infetti all'endotelio vascolare (Stuen, et al.,2013).

A. phagocytopilum modula la distribuzione dei neutrofili infetti e delle potenziali cellule ospiti inducendo la secrezione di citochine e loro recettori, e promuovendo la perdita di CD162 e CD62L. Inoltre il batterio interagisce con i ligandi della cellula ospite mediante proteine di superficie, definite adesine, per facilitare la fagocitosi all'interno della cellula ospite (Choi, et al.,2003;Parker, et al.,2003;Yago, et al.,2003; Scorpio, et al.,2004; Wang,et al.,2006; Granick, et al.,2008;Carrade,et al.,2009; Ojogun, et al.,2012; Stuen,et al.2013).

La traslocazione del batterio all'interno della cellula ospite avviene per endocitosi mediata da recettori e caveole, le differenze recettoriali e delle loro componenti tra le cellule ospiti permette di spiegare la refrattarietà all'infezione di alcuni tipi cellulari : i vari precursori della linea mieloide localizzati all'interno del midollo osseo esprimono ligandi diversi rispetto alle cellule mature circolanti e per questo sono refrattarie al legame e all'internalizzazione

del patogeno (Bayard-McNeeley, et al.,2004; Carrade, et al.,2009; Stuen, et al.,2013). Le caveole sono “zattere lipidiche specializzate ricche di proteine elipidi che presentano diverse funzioni di trasmissione dei segnali all’interno delle cellule; il loro impiego come porta di accesso permette ad *A.phagocytophilum* di bypassare l’attività fago-lisosomiale e riuscire a sopravvivere (Rikihisa,et al.,2006; Carrade,et al.,2009).

Una volta all’interno della cellula ospite *A.phagocytophilum* ha la capacità di bloccare la funzione battericida dei neutrofili infettati: riduce motilità e capacità di fagocitosi; riduce la capacità di adesione endoteliale e la trans-migrazione (normalmente avviene per rotolamento ed è mediata da selectine) ; in particolare blocca la produzione di anione superossido e la formazione del sistema NADPH ossidasi. Pare infatti che una proteina batterica (Anka A) riesca ad entrare nel nucleo e a interagire con le regioni specifiche del gene che regola i meccanismi difensivi, downregolandone l’espressione (Carlyon,et al.,2006; Garcia-Garcia,et al.,2009; Carrade,et al.,2009).

Tipicamente i neutrofili rimangono in circolo per 10-12 ore prima di entrare nei tessuti e andare incontro ad apoptosi, hanno dunque un’emivita molto breve a svantaggio della sopravvivenza del patogeno ; *A. phagocytophilum* è in grado di ritardare l’apoptosi attivando la cascata anti-apoptosi (Sarkar,2012; Stuen,2013) e questo è un aspetto fondamentale per la sua sopravvivenza e replicazione intracellulare all’interno di queste cellule (Borjesson,et al.,2005;Carlyon,et al.,2006; Lee,et al.,2006;Carrade,et al.,2009; Stuen,et al.,2013).

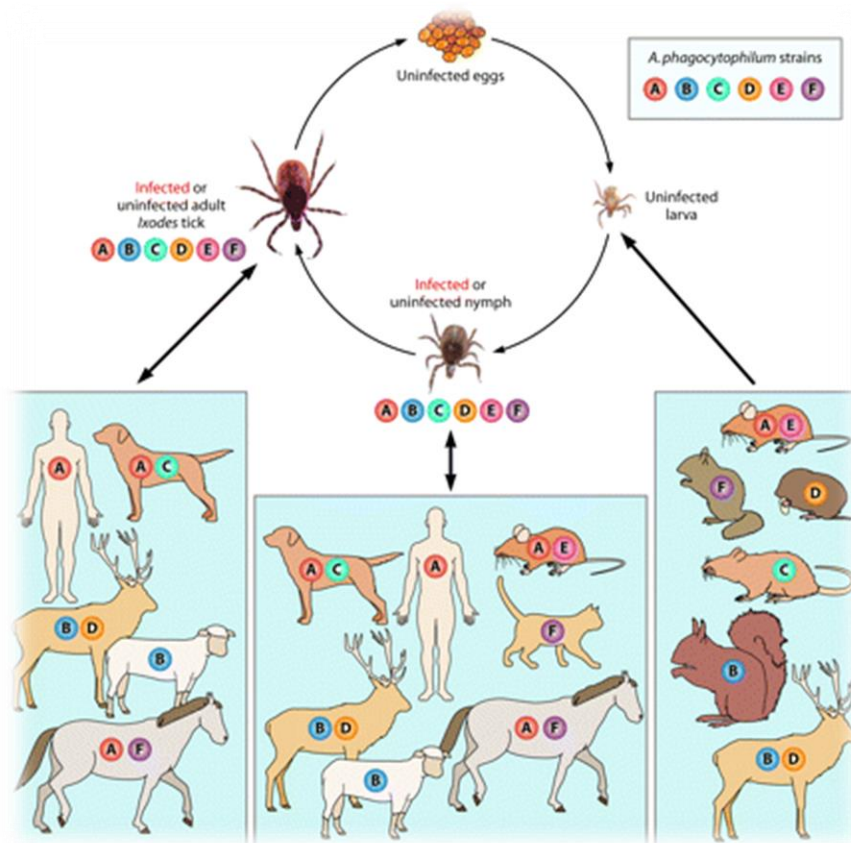


Figura 4.4 Ipotesi di ciclo biologico di *A. phagocytophilum* – Proposed life cycle of *A. phagocytophilum* (Rikihisa, 2011)

Nonostante il meccanismo di trasferimento del batterio da cellula a cellula non sia ancora chiarito, nell'uomo l'organismo induce il rilascio di IL-8 e incrementa l'espressione superficiale di CXCR2, un recettore per IL-8 che potrebbe determinare ulteriore reclutamento di neutrofili suscettibili all'infezione e la successiva assunzione ad opera di una zecca non infetta (Scorpio, et al., 2004; Carrade, et al., 2009).

E' stata dimostrata ormai da tempo la possibile trasmissione mediante trasfusione di sangue infetto, Si evidenzia pertanto la necessità di un adeguato screening dei soggetti donatori per impedire la contaminazione dei riceventi (Kirtz, et al., 2005).

La maggior parte dei cani naturalmente infetti con *A. phagocytophilum* rimane tendenzialmente in salute, come indicato dall'evidenza sierologica diffusissima di esposizione in aree endemiche in assenza di reperto anamnestico di malattia clinica (Beall, et al., 2008; Carrade, et al., 2009). E' possibile la manifestazione clinica della patologia ma, allo stato attuale, non sono riportati casi di infezione letale nel cane (Carrade, et al., 2009).

Nel cane l'anaplasmosi si manifesta, in genere dopo 1-2 settimane dalla trasmissione dell'infezione (periodo di incubazione) con: febbre (sopra 41°C); malessere; depressione;

inappetenza o anoressia; debolezza; polidipsia; vomito; indisposizione; edema distale; riluttanza al movimento; zoppia (da poliartrite neutrofilica); petecchie; sanguinamento gengivale; epistassi; tosse tipicamente debole e non produttiva; iniezione sclerale; linfadenomegalia, epatomegalia e splenomegalia rilevabili all'esame fisico con conferma ecografica o radiografica. Nel cane e nei topi da laboratorio è stato rilevato che questo ingrossamento di milza e linfonodi è riconducibile a fenomeni di iperplasia linfoide reattiva ed ematopoiesi extramidollare (Kirtz, et al.,2005; Foley,et al.,2007; Carrade,et al.,2009; Eberts,et al.,2011; Stuen,et al.,2013; Moroff,et al.,2014;Silveira,et al.,2015; Dugat,et al.,2016).

In alcuni casi, abbastanza rari, sono stati riscontrati anche segnali di coinvolgimento del SNC, ad esempio ritardato e incompleto riflesso pupillare, convulsioni e deficit propriocettivo. Tuttavia diversi studi retrospettivi non hanno dimostrato un'associazione diretta tra segni neurologici e l'infezione (Kirtz,et al.,2005; Carrade,et al.,2009).

Uno studio ha dimostrato che l'artropatia febbrile si manifesta soprattutto nei soggetti co-infettati da *A.phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi* ; la co-infezione infatti determina un'alterazione della risposta immunitaria che incruenta l'artrite provocata da *Borrelia* (Beall,et al.,2008; Eberts,et al.,2011)

Le principali alterazioni clinico-patologiche rilevate in corso di anaplasmosi sono : anemia normocitica normocromica in genere non rigenerativa (più raramente rigenerativa) ; linfopenia e solo occasionalmente linfocitosi; neutrofilia e neutropenia sono egualmente riscontrate, anche se la maggior parte dei soggetti presenta neutropenia; monocitopenia e a volte monocitosi; moderata trombocitopenia (più marcata negli stadi iniziali della patologia); incremento ALP e ALT, ipoalbuminemia; iperglobulinemia; incremento bilirubina totale (Kirtz,et al.,2005; Kohn,et al.,2008; Granick,et al.,2009; Carrade,et al.,2009; Eberts,et al.,2011).

E' importante sottolineare che diversi studi hanno dimostrato una notevole discrepanza,in termini di presentazione clinica della patologia, tra il Vecchio e il Nuovo Continente, probabile conseguenze delle differenti varianti genetiche di *A.phagocytophilum* diffuse nel mondo (Stuen,et al.,2003; Carrade,et al.,2009).

Il meccanismo alla base della trombocitopenia non è stato ancora definito: *A. phagocytophilum* può entrare nei precursori midollari della linea megacariocitica, tuttavia non sembra provocare difettosa produzione di piastrine. Anticorpi anti-piastrinici sono stati rilevati nel siero di uomini e cani affetti da anaplasmosi, pertanto il meccanismo immunomediato può contribuire all'insorgenza della trombocitopenia ma non può essere

l'unica causa, in quanto la trombocitopenia insorge nella fase acuta della patologia, prima della produzione e del rilevamento anticorpale. Probabilmente alla base vi è principalmente un meccanismo di distruzione (Kohn,et al.,2008; Granick,et al.,2008; Carrade,et al.,2009). La leucopenia e l'alterata funzione neutrofilica possono predisporre allo sviluppo di infezioni opportunistiche secondarie, soprattutto da *B.burgdorferi*, anche nell'uomo e nel cane ma più frequentemente nei ruminanti (Nyarko,et al.,2006; Bakken,et al.,2008; Carrade,et al.,2009).

I danni tissutali sono provocati principalmente dalla risposta infiammatoria piuttosto che dall'infezione stessa, in particolare da sostanza rilasciate dai neutrofili infetti o mediante induzione del fattore monocitico tissutale ad attività pro-coagulante (Carrade,et al.,2009).

L'infezione da *A.phagocytophilum* sembra essere autolimitante nel cane e, allo stato attuale, non è stata evidenziata la presenza di infezioni croniche in nessun ospite, anche se infezioni persistenti sono state riscontrate in numerose specie mammifere, tra cui pecore, cani, bovini, cavalli e cervi, in funzione della variante coinvolta (Stuen,et al.,2003; Franzèn,et al.,2009; Stuen,et al.,2013).

A causa della condivisione dei vettori artropodi e/o esposizione a zecche multiple sono possibili co-infezioni con altri patogeni trasmessi da vettori (ad esempio *E.canis* o *B.burgdorferi*) e possono complicare il quadro clinico (Carrade,et al.,2009).

L'abilità di *A.phagocytophilum* di persistere in un ospite immuno-competente nel periodo di inattività vettoriale è frutto di una complessa e coordinata interazione che, nel corso dell'evoluzione, si è instaurata tra l'organismo e il genoma di *A.phagocytophilum*, modificatosi in modo tale da avere un numero essenziale di geni e permettere pressoché infinite di combinazioni, risultanti in altrettanti antigeni ricombinati e scambi macromolecolari con la cellula ospite, (Rikihisa,et al.,2011; Rejmanek,et al.,2012; Stuen,et al.,2013).

Le batteriemie cicliche sono state spiegate come picchi periodici contenenti varianti geneticamente distinte delle principali proteine di superficie, MSP (Granquist,et al.,2008,2010; Stuen,et al.,2013).

Le varianti degli antigeni superficiali contengono degli epitopi che sono riconosciuti dagli anticorpi che appaiono successivamente ma non precedentemente al rispettivo picco di batteriemia in cui sono espressi, indicando quindi la presenza di un vero processo di variazione antigenica influenzato dalla risposta immunitaria dell'ospite (Barbet,et al.,2003; Granquist,et al.,2010; Stuen,et al.,2013).

L'immunità cellulo-mediata in genere viene considerata lo strumento principale del sistema immunitario per la clearance di patogeni intracellulari, studi sperimentali hanno dimostrato l'importanza dell'immunità umorale nella clearance dei patogeni erlichiodi, tra cui *A.phagocytophilum*: gli anticorpi possono svilupparsi dopo l'esposizione ai batteri durante le fasi extracellulari dell'infezione, possono accedere alle componenti intracellulari contenenti i patogeni o incrementare l'attività fagocitaria (Carrade,et al.,2009)

La diagnosi può essere eseguita mediante identificazione diretta, analisi sierologica o molecolare mediante PCR. La diagnosi diretta prevede il rilevamento delle morule all'interno dei neutrofili alla lettura dello striscio di sangue realizzato all'inizio del periodo febbrile e colorato con Giemsa. L'organismo appare da 4 a 18 giorni dall'infezione sotto forma di corpi elementari (0-6µm) o corpi inclusi definiti morule (4-6µm), di colore blu nel citoplasma dei leucociti granulati, soprattutto neutrofili. In realtà le morule sono rilevabili solo per un breve periodo di tempo, tipicamente tra 4 e 8 giorni dall'infezione (Kirtz,et al.,2005; Carrade,et al.,2009; Stuen,et al.,2013).

Questo metodo è caratterizzato da bassa sensibilità e specificità, principalmente per due motivi : (1) nel caso in cui la percentuale di neutrofili infetti sia ridotta (condizione di neutropenia) la loro visualizzazione nello striscio può essere difficile; (2) il rinvenimento delle morule nel sangue periferico di un cane proveniente da una zona endemica è altamente suggestivo di infezione con *A.phagocytophilum* ma non può confermarla. Pertanto è necessario ricorrere all'ausilio della sierologia o della PCR per confermare la specie dell'organismo rilevato (Kirtz,et al.,2005; Carrade,et al.,2009; Barth,et al.,2014).

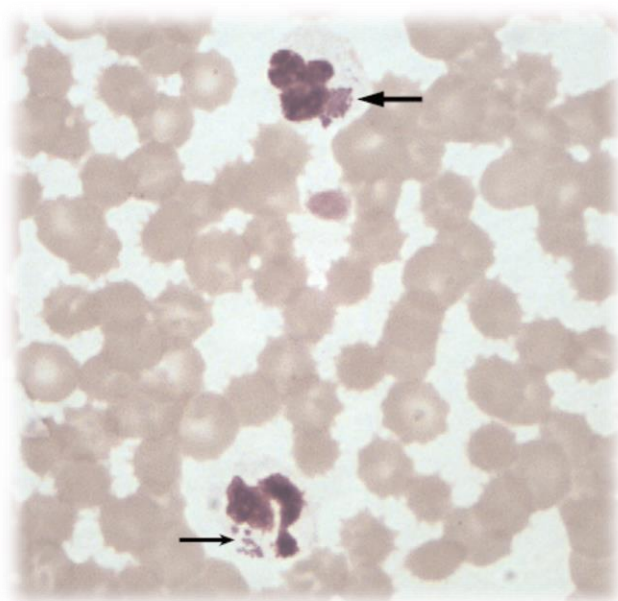


Figura 4.5. Infezione da *Anaplasma phagocytophilum*. Corpi elementari (freccia sottile) e morula (freccia

spessa) all'interno di neutrofili in uno striscio di sangue - Anaplasma phagocytophilum infection. Elementary bodies (thin arrow) and morula (thick arrow) in neutrophils in a blood smear. Hemacolor.1000 (Kirtz,2005).

L'immunoistochimica eseguita su campioni di tessuto può confermare la diagnosi (Stuen,et al.,2013)

La sierologia supporta la diagnosi rilevando specifici anticorpi anti-*A. phagocytophilum* mediante vari tipi di test, tra cui test immunofluorescenza indiretta (IFI) e vari tipi di ELISA test; il valore titolo anticorpale fissato come valore di cut-off per la positività è stato fissato a 1:80 . La diagnostica sierologica quantitativa ha un'ottima sensibilità e può essere impiegata come test di screening per rilevare l'infezione, ma presenta numerose limitazioni, tra cui ridotta specificità per effetto della cross-reattività con altri agenti rickettsiali come *E.canis* o *A.platys* e presenza di certa discrepanza tra laboratori oltre che per il fattore soggettività nella lettura del risultato.E' disponibile anche un test commerciale rapido per il rilevamento degli anticorpi nel siero di cane, Snap®4Dx® ELISA (Carrade,2009; Stuen,2013; Barth,2014); anch'esso ha una buona sensibilità ma mantiene sempre bassa specificità per la possibilità di cross-reazioni con altri batteri strettamente correlati , inoltre è stata evidenziata una certa discrepanza di risultati rispetto al test IFI o ELISA quantitativo. Tutto ciò evidenzia che è possibile avere risultati falsi-positivi con entrambi i metodi. E' importante ricordare che nella fase acuta dell'infezione entrambi i test possono risultare negativi perchè non è ancora iniziata la produzione anticorpale. Studi sperimentali hanno dimostrato che cani infetti sieroconvertono entro 8-10 giorni circa dall'esposizione; pertanto, a causa della natura acuta di questa infezione, circa il 40% dei cani clinicamente malati non presenta un livello di anticorpi rilevabili al momento dell'esecuzione del test. (Kohn, et al.,2008; Diniz,et al.,2010; Eberts,et al.,2011; Barth,et al.,2014) .

Eventuali titolazioni positive possono riflettere una precedente esposizione, e devono essere confermate mediante sieroconversione e l'incremento del titolo anticorpale di 4 volte dopo 4 settimane. I risultati positivi non confermati, in zone non endemiche per i patogeni che possono dare cross-reattività, e senza storia di viaggio recente nell'anamnesi, possono essere spiegati con la persistenza degli anticorpi sviluppatasi dopo un contatto con il patogeno (senza infezione per una capacità di limitare l'infezione) che rimangono rilevabili, secondo alcuni studi, fino a 12 mesi dopo l'infezione naturale, anche se è ancora oggetto di studio (Beall,et al.,2008; Moroff,et al.,2014; Barth,et al.,2014).

E' disponibile anche l'analisi molecolare mediante PCR per la ricerca diretta del DNA del batterio in un campione di sangue,buffy coat, midollo osseo o tessuto splenico. La PCR ha un'ottima sensibilità e specificità e, a differenza della sierologia, può rilevare la presenza

del patogeno già negli stadi iniziali dell'infezione (Beall,et al.,2008; Granick,et al.,2008; Eberts,et al.,2011;Barth,et al.,2014).

Gli svantaggi principali legati all'impiego della PCR risiedono nei costi elevati e soprattutto nella possibilità di fasi negativi; la sensibilità della PCR infatti dipende dal numero di organismi circolanti nel campione analizzato che può fluttuare ed essere ridotto negli intervalli tra i picchi della batteriemia. (Beall,et al.,2008; Barth,et al.,2014).

E' importante sottolineare che esistono varie diverse tipologie di tecniche PCR per *A. phagocytophilum* : ad esempio una tecnica ha come target il gene 16S rRNA e una che ha invece come target il gene relativo alla proteina superficiale msp2(p44). Le versioni che amplificano il gene 16SrRNA sono meno specifiche e possono amplificare anche il materiale genetico di altre specie batteriche, pertanto è necessario il sequenziamento del prodotto amplificato; i protocolli che invece hanno come target il gene msp2 sono maggiormente specifici per *A.phagocytophyllum* (Carrade,et al.,2009).

Il confronto tra le due tecniche sierologiche e la PCR ha rilevato che per la diagnosi di Anaplasmosi, la specificità della sierologia è molto bassa rispetto alla PCR. Il vantaggio principale dell'IFAT rispetto allo Snap® è la quantificazione del titolo anticorpale (Barth,et al.,2014).

In definitiva, per una diagnosi completa di anaplasmosi è consigliabile interpretare i risultati dei test sierologici e/o dell'analisi molecolare insieme ai dati anamnestici, ai rilievi clinici e clinico-patologici

Ehrlichiosi granulocitica canina

Ehrlichiosi monocitica canina è una malattia infettiva non contagiosa sostenuta da *Ehrlichia canis*, batterio Gram negativo appartenente alla famiglia delle Anaplasmataceae, che viene trasmessa principalmente dalla zecca *R.sanguineus* (in genere la trasmissione avviene dopo 3 ore dall'inizio del pasto di sangue) (Aguirre,et al.,2004; Shpynov,et al.,2006; Spitalska,et al.,2008;Little,et al.,2010; Gaunt,et al.,2010 Fourie,et al.,2013; Ebani,et al.,2014; Sainz, et al.,2015;Renè- Martellet, et al.,2015)

E' stata dimostrata anche la potenziale trasmissione mediante sangue trasfusionale infetto (Sainz,et al.,2015), per tale motivo si ritiene necessario l'adeguato screening mediante PCR dei soggetti donatori nelle aree fortemente endemiche, in modo da garantire la sicurezza delle unità donate (Sainz,et al.,2015)

L'intera regione del bacino del mediterraneo è endemica per *E.canis*, e studi recenti hanno dimostrato l'espansione verso Nord (ad es. Svizzera o Germania) (Beugnèt,et al.,2009; Sainz,et al.,2015; Renè – Martellet,et al.,2015).

Studi recenti hanno dimostrato che il Sud Italia (in particolare Sicilia e Sardegna) ha un'incidenza di rischio maggiore rispetto ad altri paesi Mediterranei come la Spagna e il Portogallo, anche se in Italia *E.canis* è stata riscontrata su tutto il territorio. A parte focolai "hot-spot" è evidente la presenza di un gradiente di distribuzione da Nord a Sud, in funzione del gradiente di distribuzione della zecca vettore (Renè – Martellet, et al.,2015).

Uno studio ha dimostrato che *E.canis* è il più diffuso patogeno trasmesso da zecche nella popolazione canina del Centro Italia, con una sieroprevalenza del 7,07% , e senza significative differenze tra ambiente urbano e rurale, in funzione dell'adattabilità ambientale della zecca vettore (Ebani, et al.,2014).

Il cane rappresenta l'ospite definitivo per eccellenza di *E.canis*, tuttavia possono essere infettati anche i canidi selvatici (lupi, volpi, sciacalli), in qualità di ospiti accidentali (Ebani,et al.,2011,2014; Torina,et al.,2013; Sainz,et al.,2015), tuttavia l'infezione sperimentale è stata riprodotta esclusivamente sul cane. Numerosi studi nel mondo riportano il riscontro del DNA di *E.canis* nel gatto e in generale dei felidi ma, allo stato attuale, il batterio non è mai stato isolato in queste specie (Andre,et al.,2010; Braga,et al.,2012; Maia,et al.,2014; Sainz,et al.,2015).

Al momento *E.canis* non è considerato un agente potenzialmente zoonotico, anche se un organismo strettamente correlato a è stato descritto in alcuni uomini in Venezuela (Perez,et al.,1996; Sainz,et al.,2015).

Non sono state evidenziate particolari predisposizioni di età, sesso o razza. Fondamentalmente tutte le razze possono essere colpite da Ehrlichiosi canina, anche se è stato dimostrato che il Pastore Tedesco e il Siberian Husky sono predisposti a sviluppare i segni clinici in forma più grave e, di solito, presentano prognosi peggiore, principalmente per una ridotta risposta dell'immunità cellulo-mediata (Sainz,et al.,2015).

Solamente alcuni studi hanno evidenziato una maggiore sieroprevalenza nei maschi, legata principalmente ad una maggiore esposizione ai vettori per caratteristiche comportamentali; analogamente è possibile riscontrare una sieroprevalenza più elevata nei soggetti adulti-anziani rispetto ai cuccioli per una maggiore sensibilità (Watanabe,et al.,2004; Costa,et al.,2007; Sainz,et al.,2015).

Il ciclo biologico è molto simile a quello di *A.phagocytophilum*: il batterio viene trasmesso dopo circa 3 ore dall'inizio del pasto di sangue, viene fagocitato dalle cellule target, ovvero

i monociti, e al loro interno, dentro vacuoli ricavati dalla membrana della cellula ospite, si replica per scissione binaria (formando le caratteristiche morule) sino alla lisi dell'ospite (Allison,2013). Anche *E. canis* durante il ciclo biologico va incontro a tre diversi stadi di sviluppo : Corpi elementari, Corpi iniziali e Morule. Mediante i monociti infetti il batterio si diffonde nei tessuti, tra cui linfonodi e milza, e determina la patologia. E' importante ricordare che in corso di infezione naturale la rickettsiemia si mantiene per mesi, in genere con bassa carica circolante in alternanza a picchi. Dopo un periodo di incubazione di 1-3 settimane possono svilupparsi sequenzialmente 3 tipiche fasi della malattia: fase acuta, fase subclinica e fase cronica. Nella fase acuta della malattia, l'infezione di nuove cellule è subordinata alla fagocitosi del microorganismo da parte delle stesse, nella fase subclinica ed in quella cronica l'ingresso del patogeno all'interno del macrofago sembrerebbe mediato dalle opsonine (IgG e componente C3b del complemento) adese alla superficie della cellula batterica. La produzione di immunocomplessi potrebbe rappresentare la base patogenetica per lesioni quali uveite, poliartrite e glomerulonefrite (Little,2010).

Lo stadio acuto può durare 2-4 settimane, al termine delle quali i segni clinici possono variare o scomparire, anche spontaneamente (alcuni soggetti possono rimanere portatori subclinici persistenti per mesi se non addirittura anni). Lo stadio subclinico segue quello acuto, è caratterizzato dall'assenza di segni clinici ma reperto di alterazioni clinico-patologiche, tra cui concentrazione piastrinica subnormale.

Non tutti i soggetti infetti evolvono nella fase cronica in cui i segni clinici sono piuttosto gravi e simili a quelli della fase acuta (difficile distinzione), tra cui ipoplasia del midollo osseo e grave pancitopenia. Al momento non esistono studi in grado di chiarire completamente la differente risposta dell'animale all'infezione o i fattori che inducono a sviluppare la forma cronica (McClure,et al.,2010; Gaunt,et al.,2010; Sainz,et al.,2015).

I segni clinici legati all'infezione da *E.canis* sono variabili in funzione di tanti fattori tra cui: ceppo di *E.canis*, risposta immunitaria del soggetto, presenza di infezioni concomitanti con altri patogeni trasmessi da vettori.

In generale *E.canis* può provocare segni clinici piuttosto gravi, sicuramente più gravi rispetto ad (Komnenou,et al.,2007; Tabar,et al.,2009; Diniz,et al.,2010; Little,2010; Sainz,et al.,2015).

I segni clinici di ehrlichiosi sono molto variabili e, molto spesso, scarsamente patognomonicamente : febbre ; debolezza ; letargia; anoressia; linfadenomegalia; splenomegalia; epatomegalia; perdita di peso; vomito ; diarrea; dolorabilità; intolleranza all'esercizio fisico; edema (arti anteriori , coda , scroto) ; tosse e/o dispnea (associata a polmonite); scolo

oculonasale sieroso o mucopurulento; aborto o morte neonatale ; ulcere cutanee. I segni clinici più comuni di ehrlichiosi includono: pallore delle mucose da anemia; epistassi; comparsa di petecchie ed ecchimosi; prolungamento del tempo di sanguinamento; prolungato sanguinamento durante l'estro; ematuria o melena associate a trombocitopenia - trombocitopenia o vasculite. Sono molto comuni anche i segni a livello oculare come, ad es,uveite anteriore,opacità della cornea, ma e altri. Sono stati descritti anche segni neurologici in corso di Ehrlichiosi (atassia, head tilt, nistagmo, convulsioni) ma sono molto meno comuni e, in genere, secondari alla meningite (Gaunt,et al.,2010; Little,2010; Allison,et al.,2013; Ebani,et al.,2014;Sainz,et al.,2015).

La letteratura più datata riporta, tra i segni di Ehrlichiosi, anche zoppia da poliartrite; studi più recenti hanno dimostrato che la comparsa di questi segni è prevalentemente associata a co-infezione con altri patogeni, come *A.phagocytophilum* o *B.burgdorferi*. La co-infezione Ehrlichia-Anaplasma spp. è piuttosto frequente, in quanto specie trasmesse dallo stesso vettore, possono essere riscontrate anche co-infezioni con altre CVBDs, ad esempio la Leishmaniosi. La presenza delle co-infezioni è molto importante a livello clinico in quanto determina condizione di occultamento – peggioramento dei segni clinici, complicando notevolmente la diagnosi (Sainz,et al.,2015).

Le alterazioni clinico-patologiche riscontrabili sono variabili e non specifiche, la più importante è rappresentata dalla grave trombocitopenia. Vengono riscontrate anche: anemia lieve -moderata normocitica-normocronica non rigenerativa; neutropenia - neutrofilia; linfopenia; monocitosi: linfocitosi granulare (raro); trombocitopenia; pancitopenia in corso di ipoplasia -aplasia midollare (forme croniche); iperproteinemia; iperglobulinemia con ipergammaglobulinemia in genere policlonale; ipoalbuminemia; proteinuria; azotemia renale; lieve incremento ALT e ALP (Kohn,et al.,2008; Granick,et al.,2009; Little,2010; Sainz,et al.,1999,2015).

La diagnosi di *E.canis* può essere effettuata mediante lettura dello striscio ematico, indagine sierologica o analisi molecolare mediante PCR. La lettura dello striscio ematico permette l'individuazione delle morule (aggregati di organismi in replicazione) all'interno del citoplasma dei monociti. L'aspetto classico della morula è quello di una struttura intracitoplasmatica basofilica e granulare. Tale riscontro è piuttosto raro se si impiega il sangue intero (4-6% casi clinici) mentre molto più facile nel caso in cui lo striscio sia realizzato mediante buffy coat ,o ancora meglio, aspirato di milza (è stato dimostrato che *E.canis* persiste più a lungo nella milza rispetto al sangue periferico)(Allison,et al.,2013;

Sainz,et al.,2015). In linea generale questo metodo ha una bassa sensibilità, pertanto deve essere supportato da ulteriori test diagnostici (Sainz,et al.,2015).

Alcuni studi su cani naturalmente infetti da *E.canis* hanno rilevato che la sensibilità diagnostica della lettura dello striscio è estremamente variabile (valori tra 0-58%), per il fatto che la maggior parte delle ehrlichiosi viene diagnosticata durante lo stadio cronico, ovvero quando le morule sono più difficilmente rilevabili (Allison,et al.,2013).

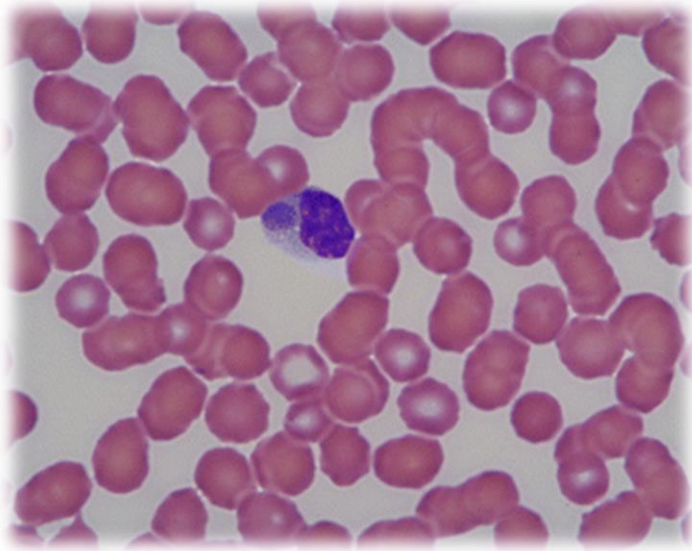


Figura 4.6. Immagine microscopia di una morula di *E.canis* nel citoplasma di un monocita - Microscopic image of a morula of *Ehrlichia canis* in the cytoplasm of a monocyte (x100) (Sainz,2015).

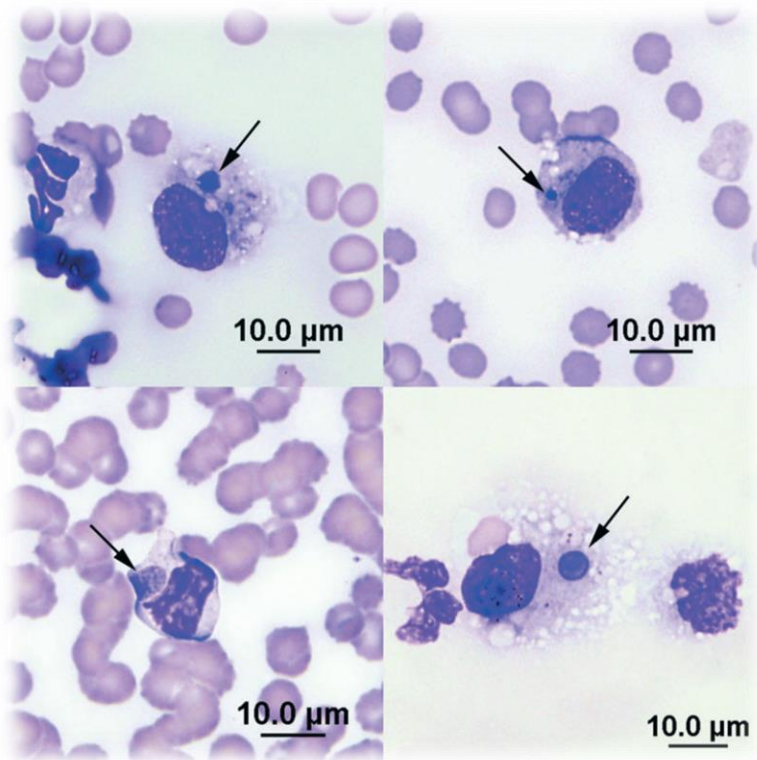


Figura 1.7 Morule di *Ehrlichia monocitica* nelle cellule di sangue periferico canino- *Monocytic Ehrlichia morulae* in canine peripheral blood cells (arrows) have variable morphology. Aqueous Romanowsky (Allison,2013).

Le tecniche sierologiche maggiormente impiegate per la diagnosi di ehrlichiosi sono test quantitativi IFAT o ELISA, che permettono di determinare il livello di anticorpi presenti nell'organismo e valutare l'andamento della titolazione nel tempo. Sono stati messi a punto kit commerciali rapidi per la pratica clinica ma, rispetto ai test quantitativi di laboratorio, presentano ridotta specificità e sensibilità. Oltre a ciò i test rapidi sono test di tipo qualitativo e rilevano solamente positività o negatività, senza dare informazioni sulla titolazione anticorpale del soggetto (Little,2010; Sainz,et al.,2015).

La positività sierologica indica tendenzialmente un'infezione passata o presente, ma non sempre denota una condizione di malattia in corso; in particolare una singola titolazione positiva può semplicemente indicare un contatto o un'infezione passata ormai risolta, in quanto gli anticorpi prodotti persistono in circolo per diversi mesi sino ad anni (Gaunt,et al.,2010; Kohn,et al.,2011; Sainz,et al.,2015). Nelle aree fortemente endemiche per *E.canis* la sieroprevalenza è elevata. In cani naturalmente infetti da *E.canis* alcuni autori hanno evidenziato che cani con titoli IFAT elevati tendono ad essere anche PCR positivi, a sostegno di una correlazione tra titolazione anticorpale e infezione attiva, ma queste informazioni devono essere confermate. La letteratura più recente è concorde nell'affermare che la sierologia mostra maggiore utilità nel valutare la cinetica della produzione anticorpale del tempo e permettere quindi una valutazione della dinamica dell'infezione, mediante 2 o più test ripetuti nel giro di 2-4 settimane (sieroconversione) ;è stato dimostrato infatti che la quadruplicazione del titolo di IgG nel dato intervallo di tempo può essere considerata evidenza di infezione in corso (Allison,et al.,2013; Sainz,et al.,2015).

Per la diagnosi "statica" di infezione è preferibile associare la diagnostica sierologica all'analisi molecolare mediante PCR, in quanto il riscontro del DNA batterico nel campione in esame è palesemente segno di infezione attiva (Maggi,et al.,2014; Sainz,et al.,2015).

E' importante ricordare che la sierologia, come per altre CVBDs, può dare risultati falsi negativi, principalmente se eseguita durante il periodo di incubazione o nelle fasi iniziali dell'infezione, quando la carica batterica è ancora piuttosto bassa e non ha ancora stimolato la produzione anticorpale (tipicamente inizia 12-14 giorni dopo l'infezione) (Sainz,et al.,2015).

La sierologia può inoltre fornire risultati falsi positivi per la presenza di cross-reattività tra *Ehrlichia* e altri organismi rickettsiali come *A .phagocytophilum* (cross-reattività descritta

soprattutto quando uno dei due patogeni è presente ad alto titolo o il follow-up è prolungato). Nel caso in cui gli anticorpi cross-reagiscano con più di un antigene /patogeno, il titolo anticorpale più alto indica il patogeno infettante più probabile nel soggetto (Sainz,et al.,2015).

L'analisi molecolare mediante PCR è il test con maggior grado di specificità e risulta estremamente utile per diversi motivi: (1) permette di rilevare, anche nelle fasi iniziali dell'infezione, il DNA del patogeno considerato evidenza di infezione; (2) la PCR permette la quantificazione della carica infettante mediante tecnica real-time. I principali svantaggi legati alla PCR sono legati alla necessità di ricorrere a laboratori esterni (in realtà vale anche per la sierologia) e ai costi elevati. E' necessario sottolineare che anche la PCR può fornire risultati falsi positivi, principalmente in caso di utilizzo di primers poco specifici perché comporta amplificazione non specifica, e falsi negativi in caso di assenza del batterio del campione o al di sotto della soglia di rilevamento del test. Pertanto i risultati negativi indicano semplicemente l'assenza del DNA del batterio in quel determinato campione analizzato con quel determinato protocollo, e non devono essere interpretati come prova dell'assenza di infezione (Alleman,et al.,2006,2007; Allison,et al.,2013;Sainz,et al.,2015).

Il campione abituale per l'esecuzione della PCR è sangue intero periferico in EDTA; alcuni studi hanno suggerito una maggiore specificità dell'aspirato di milza (Sainz,et al.,2015).

Leishmaniosi canina

La Leishmaniosi canina è una patologia a diffusione globale trasmessa da vettori e causata dal protozoo *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Questa patologia rappresenta un grave problema di salute pubblica in quanto zoonosi potenzialmente letale e il cane domestico rappresenta il principale ospite reservoir. I vettori competenti di *L. infantum* sono rappresentati dalle femmine dei flebotomi (*Diptera: Phlebotomidae*) appartenenti a numerose specie; nell'area del bacino del mediterraneo le specie maggiormente coinvolte sono *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* e *P. tobbi*. La leishmaniosi è una patologia dall'andamento tipicamente stagionale, dalla primavera all'autunno, in funzione del periodo di attività dei vettori competenti (Gramiccia,2005; Castagnaro,2007; Solano – Gallego,2011; EFSA, 2015).

La Leishmaniosi canina è endemica in più di 70 paesi in tutto il mondo compresi tra Europa Meridionale, Africa, Asia, America Centro-Meridionale ed è stata recentemente riportata anche negli USA (Solano -Gallego,2011).

Per quanto riguarda l'Europa la Leishmaniosi è endemia in tutta l'area del bacino del Mediterraneo comprendente Cipro, Grecia, Albania, Croazia, Italia, Malta, Francia, Spagna e Portogallo. E' stata ipotizzata recentemente l'endemizzazione anche nell' area dei Balcani (Romania, Bosnia, Macedonia, Montenegro e Bulgaria) (Solano-Gallego,2011; Pennisi,2014).

Negli ultimi anni è stata registrata, sempre più frequentemente, l'espansione della patologia verso latitudini settentrionali e altitudini più elevate, in zone precedentemente considerate esenti; sono stati infatti segnalati nuovi casi in paesi dell'Europa Centro-Settentrionale come Olanda, Regno Unito, Germania, Danimarca e Ungheria. L'origine del fenomeno è stata attribuita all'espansione geografia del vettore competente, resa possibile da cambiamenti climatici, ambientali e socio-demografici. Sulla base di ciò, allo stato attuale, la Leishmaniosi canina viene considerata come patologia a diffusione europea e in continua estensione (Maroli,2008; Solano – Gallego,2011; EFSA,2015).

Per quanto riguarda la situazione epidemiologica in Italia, fino agli anni '80 la Leishmaniosi era considerata una patologia radicata nel Meridione, mentre le regioni Centro-Settentrionali erano completamente esenti. A partire dagli anni'90, sulla scia del trend europeo, la sua incidenza ha iniziato ad aumentare in ogni regione già endemica e sono comparsi i primi focolai autoctoni in regioni precedentemente non infette, quali Piemonte, Valle d 'Aosta, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Veneto e Friuli Venezia Giulia (Castagnaro,2007; Maroli,2008).

In Italia la regione del Lazio è considerata tra i territori più endemici per la Leishmaniosi umana e canina, provocata da *L.infantum* *MON-1* e trasmessa dal vettore *P.perniciosus* (Rossi, 2008 ; Gramiccia,2013 ; Alten, 2016)

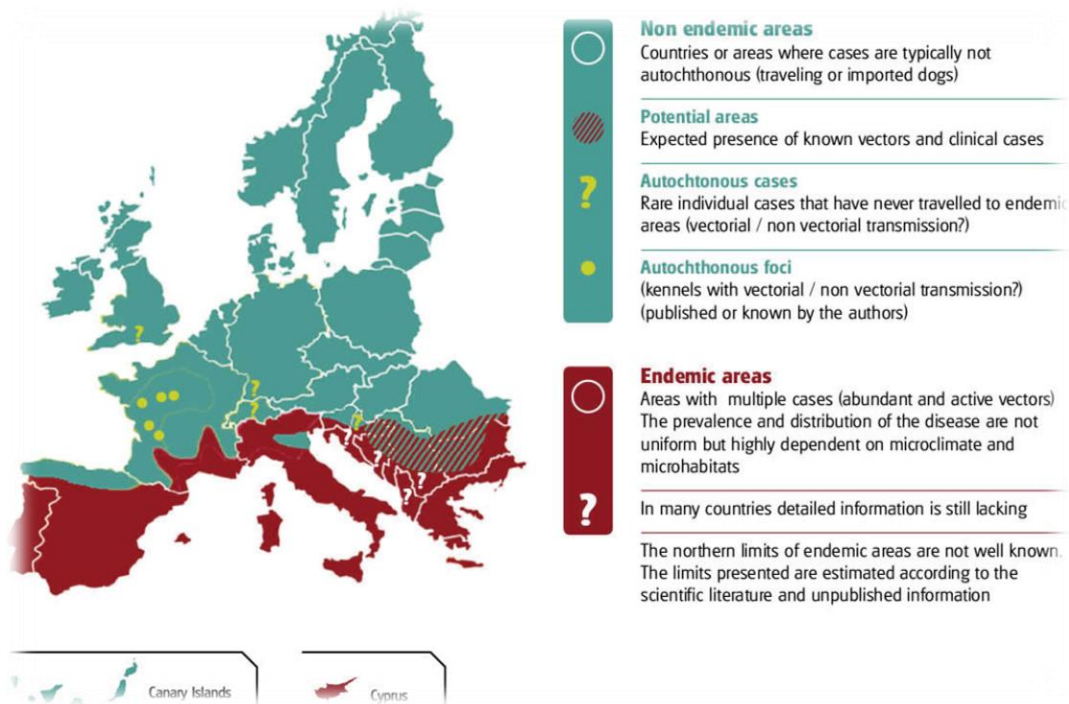


Figura 4.8 Distribuzione di *L.infantum* in Europa – The Distribution of canine *L.infantum* infection in Europe (Solano-Gallego,2011)

Una caratteristica epidemiologica molto importante della Leishmaniosi nelle aree endemiche è il contrasto tra l’alta prevalenza di infezione e bassa prevalenza di malattia clinica. Le stime di prevalenza sono molto variabili, in quanto dipendono dalla reale prevalenza e dai test diagnostici che vengono utilizzati, ovvero test immunologici o analisi PCR. I test sierologici tendono a fornire una sottostima della prevalenza reale, in quanto solo una parte dei cani infetti sviluppa una risposta umorale rilevabile; l’analisi molecolare mediante PCR invece fornisce dati più veritieri e vicini alla reale prevalenza di infezione. La bassa prevalenza della malattia clinica può essere ricollegabile alle difficoltà diagnostiche connesse, soprattutto nelle zone non tradizionalmente endemiche, e ad una ridotta segnalazione dei casi riscontrati, in funzione del fatto che la Leishmaniosi non è considerata malattia soggetta a denuncia obbligatoria in moltissimi paesi europei (Pennisi,2014; EFSA,2015).

Il cane domestico rappresenta l’ospite preferenziale per *L.infantum* e ormai è ampiamente riconosciuto il suo ruolo anche di principale ospite reservoir del protozoo, sostenuto dall’elevata prevalenza di infezione canina nelle aree endemiche e dallo stretto legame tra flebotomi e cani (EFSA,2015).

Anche altre specie mammifere possono avere un ruolo, nel ciclo biologico di *L.infantum*, soprattutto in qualità di ospiti reservoir secondari o ospiti occasionali a limitata rilevanza

epidemiologica : volpe rossa, sciacallo dorato, lupo, lepre, coniglio, ratto nero e marrone e topi (Maia,2015).

I gatti domestici possono essere infettati da *L.infantum*, le manifestazioni cliniche sono rare e, quando presenti, molto simili a quelle del cane (EFSA,2015).

In quanto patologia zoonotica, *L.infantum* può infettare anche l'uomo e, nelle regioni endemiche, rappresenta un importante problema di sanità pubblica soprattutto per bambini e adulti immuno-compromessi (Maia,2015).

La principale via di trasmissione di *Leishmania infantum* per i mammiferi è data dal morso delle femmine di insetti appartenenti al genere *Phlebotomus*, in particolare *P. perniciosus* e *P. ariasi* nei paesi maggiormente endemici del Mediterraneo (Italia, Francia, Spagna e Portogallo) (Maia,2015).

Anche la zecca *R.sanguineus* è stata candidata come potenziale vettore del parassita, per il riscontro di tracce di DNA di *L. infantum* in alcune popolazioni, tuttavia l'ipotesi deve essere confermata (EFSA,2015).

Anche se meno comuni, sono stati segnalate forme di trasmissione verticale e orizzontale di *L.infantum*. La trasmissione verticale congenita da madre a feto è riportata nell'uomo ed evidenziata da alcuni studi anche nel cane, anche se la sua frequenza nelle aree endemiche è sconosciuta a causa del rischio di esposizione ai vettori (Royspal,2005; Boggiatto,2011; Solano -Galelgo,2011).

La trasmissione orizzontale può avvenire in vari modi : (1) trasmissione mediante trasfusione di sangue infetto, ormai accertata sia nella specie umana che nel cane (De Freitas,2006; Tabar,2008; Solano-Gallego,2011) ; (2) trasmissione venerea (nel cane), ipotizzata per giustificare la presenza di un numero elevato di cani infetti in zone a scarsa popolazione vettoriale e ridotto numero di casi umani, anche a seguito del rilevamento, in uno studio, di forme di amastigoti di *L.infantum* negli organi genitali e nel seme di cani affetti da Leishmaniosi viscerale e lesioni genitali associate (Solano- Gallego,2011) ; (3) trasmissione per contatto diretto cane – cane , suggerita a seguito della comparsa di focolai di Leishmaniosi in cani Foxhounds negli Stati Uniti e in Canada, zone esenti da flebotomi (Chamaille,2010; Solano – Gallego,2011).

Il ciclo vitale di *L. infantum* è relativamente semplice :la femmina ematofaga di flebotomo inietta, durante il pasto di sangue su un ospite mammifero sensibile, i promastigoti del protozoo; i promastigoti vengono rapidamente fagocitati dai macrofagi presenti localmente, al cui interno si trasformano in amastigoti tissutali e iniziano a replicarsi per scissione binaria dentro un vacuolo parassitofo. In relazione ad un insieme di fattori legati

all'ospite e al parassita, *L. infantum* si diffonde e infetta altri macrofagi nel sito di infezione cutanea o all'interno di organi linfoidi secondari, con eventuale parassitemia. Il vettore flebotomo si infetta nutrendosi su un ospite infetto con lesioni cutanee attive, in caso di Leishmaniosi Cutanea, o parassitemia in corso, Leishmaniosi Viscerale; nell'intestino medio dell'insetto i parassiti si trasformano in promastigoti e si replicano abbondantemente in un arco di tempo tra i 4 e 14 giorni. Dall'intestino medio migrano nell'apparato buccale del vettore e lì diventano promastigoti metaciclici infestanti in attesa di iniziare un nuovo ciclo in un nuovo ospite (Urquhart, 2007; Taylor, 2010; Solano -Galego, 2011; Esch, 2013; EFSA, 2015).

Leishmania spp. ha un proprio meccanismo di virulenza che gli permette di persistere all'interno dei macrofagi dell'ospite e instaurare un'infezione cronica a lungo termine. In seguito al morso del vettore flebotomo delle sostanze chemoattrattive presenti nella sua saliva richiamano neutrofili e macrofagi nel sito di nutrimento (Peters, 2008; Esch, 2013). I promastigoti vengono fagocitati dai neutrofili ma inibiscono l'acidificazione del fagosoma in cui sono contenuti e riescono quindi a sopravvivere, anche se è stato visto all'interno dei neutrofili non riescono a trasformarsi in amastigoti e a replicarsi (Esch, 2013).

In seguito all'apoptosi dei neutrofili i parassiti sopravvissuti vengono fagocitati da macrofagi locali e infiltranti; anche le cellule dendritiche possono infettarsi mentre diventano mature e migrano nel linfonodo di competenza. Una specie di *Leishmania*, *L. amazonensis*, inibisce in modo specifico la maturazione delle cellule dendritiche incrementando l'attivazione del mediatore ERK dal fagosoma, con conseguente calo della produzione di IL-12, fondamentale mediatore pro-infiammatorio (Boggiatto, 2009; Esch, 2013). *L. infantum*, sottoforma di amastigote, è resistente all'ambiente acido e persiste all'interno di vacuoli LAMP1 e Rab7-positivi; lì si replicano fino all'eventuale lisi della cellula ospite. L'abilità del parassita di dirigere gli spostamenti del fagosoma e ritardare la fusione del fagolisosoma è legata alla presenza di lipofosfoglicani di superficie con diverse catene laterali (Esch, 2013).

Leishmania spp. Inoltre è in grado di procurarsi i nutrienti necessari per la sua sopravvivenza e crescita, in particolare il Fe^{2+} , mediante espressione di LIT-1 (Esch, 2013).

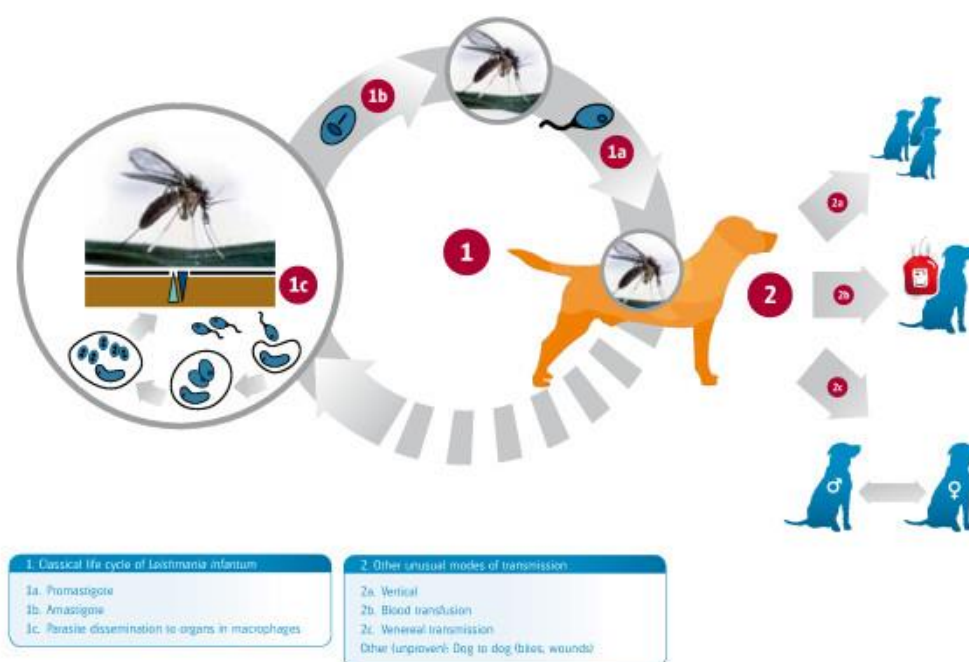


Figura 4.9 Ciclo biologico di *L.infantum* con indicazione di modalità di trasmissione non legate al vettore flebotomo dimostrate e non dimostrate - The life cycle of *L. infantum* with indication of proven and unproven non-sandfly routes of transmission to dogs. (Solano – Gallego,2011)

L'infezione da *L. infantum* presenta tre principali caratteristiche patogenetiche; (1) i macrofagi rappresentano il target principale nell'organismo ospite e sede della loro replicazione; (2) l'insorgenza e l'evoluzione della malattia dipendono dalla risposta infiammatoria ed immunitaria dell'ospite; (3) l'infezione persiste all'interno dei tessuti. *Leishmania* tende a localizzarsi nei tessuti ricchi di cellule monocitiche-macrofagiche e li può essere individuata. Una parte di cani infetti può diventare negativa ad alcuni test diagnostici dopo un breve periodo dal primo risultato positivo e senza alcun trattamento, ciò può essere riconducibile alla clearance del parassita o al sequestro del parassita all'interno di tessuti dove non può essere rilevato da tali test (Castagnaro,2007).

Probabilmente come conseguenza di meccanismi co-evolutivi, le alterazioni emostatiche e immunitarie a livello del sito di nutrimento giocano un importante ruolo nella trasmissione del protozoo, soprattutto perché influenzano il suo instaurarsi nell'organismo ospite.

E' oramai noto che l'inoculazione cutanea in ospiti suscettibili di un numero relativamente basso di promastigoti coltivati non sempre determina l'insorgenza della malattia; al contrario lo stesso numero di parassiti provoca rapidamente infezione stabile se trasmessi da flebotomi vettori. I flebotomi infatti inoculano nell'ospite anche delle sostanze che favoriscono l'infezione ,in particolare alcune componenti salivari e il "promastigote

secretory gel” una matrice prodotta nel foregut intestinale dell’insetto (tratto craniale) ove si trovano i promastigoti metaciclici (Maroli,2013).

Numerosi esperimenti in vivo hanno dimostrato che la co-infezione di *Leishmania spp*, con saliva di flebotomo naturale o artificiale aumenta notevolmente il successo dell’infezione e determina la comparsa di lesioni più estese e una maggiore carica parassitaria nei tessuti di pertinenza (Maroli, 2013).

Tra le varie ipotesi avanzate per spiegare questo fenomeno, sicuramente le più plausibili parlano di alterazioni a carico delle cellule APC (Antigen – Presenting Cell) e lo sviluppo di una risposta Th2 - IL-4 mediata. E’ stato dimostrato che l’esposizione ripetuta di ospiti canini e umani ai morsi di flebotomi non infetti stimola la produzione di IgG contro le proteine salivari, in particolare IgG1 e IgG2 per *P. perniciosus*. Gli ospiti morsi sviluppano inoltre una forte risposta cellulare contro le componenti salivari (Vlkova,2011; Maroli,2013).

Paradossalmente l’immunità stimolata dalla saliva del vettore flebotomo, in alcuni modelli sperimentali, sembra avere un ruolo protettivo nei confronti di *Leishmania spp* : questo suggerisce che la vaccinazione contro gli antigeni vettoriali può rappresentare un metodo innovativo di controllo della leishmaniosi (Maroli,2013).

Il principale svantaggio risiede nel fatto che esiste una grande varietà di associazioni naturali vettori – specie di parassita e un’ampia differenza di antigeni salivari tra le varie specie di flebotomi oltre che all’interno della stessa specie, come recentemente dimostrato (Rohousova, 2012), pertanto la protezione offerta dal vaccino sarebbe estremamente specifica e questo ne abbassa la praticabilità (Maroli,2013).

L’intervento immunitario contro *L. infantum*, in quanto patogeno intracellulare, si basa su una tempestiva e appropriata risposta T Helper 1, comprendente la produzione di IL-12 ad opera di cellule dendritiche e macrofagi, efficiente presentazione MHC-II e conseguente produzione di IFN- γ da parte della popolazione T. La clearance dell’infezione da parte del sistema immunitario innato è legata primariamente alla distruzione intracellulare del protozoo mediante superossido e ossido nitrico nei fagolisosomi dei macrofagi infetti, stimolata dall’IFN- γ prodotto inizialmente dalle cellule NK e successivamente dalle cellule T (Esch,2013).

Da un punto di vista clinico la Leishmaniosi canina è una malattia potenzialmente grave e fatale a cui i cani sono altamente suscettibili, anche se il quadro clinico e clinico-patologico è molto variegato. I segni clinici sono stati osservati fin da sei mesi di età, ma spesso è necessario più di un anno dall’esposizione al vettore flebotomo per sviluppare i primi segni

o anomalie clinico-patologici. La Leishmaniosi può evolvere da forma asintomatica a malattia sistemica, nelle forme clinicamente manifeste può apparire come forma auto-limitante cronica o malattia grave non auto-limitante. A causa di questa variabilità il gruppo LeishVet ha proposto una semplificazione di individuazione del quadro clinico, terapia e prognosi mediante la distinzione di quattro stadi clinici, sulla base di segni clinici, reperti di laboratorio e stato sierologico (Solano – Gallego,2011; EFSA,2015).

Ogni soggetto infetto può passare attraverso diversi stadi clinici nel corso della loro vita, le transizioni possono essere innescate da diversi fattori quali predisposizioni individuali, età avanzata, carenza di uno o più elementi del sistema immunitario, neoplasie concomitanti, farmaci immunosoppressivi. Alcune razze come Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastore Tedesco sembrano essere maggiormente suscettibili rispetto ad altre nel sviluppare e manifestare la patologia (Castagnaro,2007; Solano – Gallego,2011); altre invece come il Podenco Ibicenco raramente manifestano segni clinici di Leishmaniosi (Solano – Gallego,2000,2011). Anche l'età sembra essere un fattore importante, è stata dimostrata una maggiore prevalenza nei soggetti di età inferiore ai 3 anni e maggiore di 8 anni (Cardoso, 2004; Castagnaro,2007; Solano -Gallego,2011).

L'infezione può partire in forma localizzata ed evolvere in forma sistemica a causa della diffusione del parassita attraverso i vasi linfatici o sanguigni. I segni clinici maggiormente riscontrati nei cani infetti sono di natura cutanea: alopecia; dermatite esfoliativa; dermatite ulcerosa; noduli; papule e pustole; onicogriposi (Solano - Gallego,2009,2011).

Il coinvolgimento renale spesso può essere l'unica manifestazione clinica della malattia e da proteinuria lieve può evolvere in sindrome nefrosica o ad uno stadio terminale della malattia renale; glomerulonefrite e proteinuria sono segni molto frequenti in corso di Leishmaniosi canina (10-30% sul totale di soggetti malati) (EFSA,2015).

Altri segni che possono essere riscontrati: febbre; diarrea; emorragia intestinale; epato-splenomegalia; ipercheratosi; ulcerazioni cutanee soprattutto a livello della sona periorbitale e nasale; cheratocongiuntivite e altre lesioni oculari; zoppia provocata da poliartrite, anche se non necessariamente presente in tutti gli animali. L'iter sintomatologico classico della patologia prevede perdita di peso e linfadenomegalia come primi segni, seguiti successivamente dalla comparsa delle alterazioni cutanee e dai segni oculari (Solano-Gallego,2011).

All'interno della stadiazione precedentemente citata la valutazione della gravità della malattia viene effettuata in base al grado di coinvolgimento renale, valutato mediante gli esami di laboratorio : (1) Fase I = assenza di malattia renale evidente (malattia lieve); (2)

Fase II = presenza di una proteinuria molto mite (malattia moderata) ; (3) Fase III = malattia renale cronica IRIS stadio I o II, sulla base di valori di azotemia e proteinuria (grave malattia); (4) Fase IV = malattia renale cronica IRIS stadio III o IV (malattia molto grave). Il sistema dei quattro stadi clinici è stato improntato allo scopo di coprire l'ampio spettro di manifestazioni cliniche e gli stadi di gravità che si possono riscontrare in corso di Leishmaniosi (Solano- Gallego,2011).

In linea generale i cani possono essere considerati esposti, infetti o malati : (1) cane esposto = si definisce tale un soggetto clinicamente sano, con esito negativo a test istologici, parassitologici e molecolari e con specifici titoli anticorpali non superiori a quattro volte il valore soglia del laboratorio di riferimento ; (2) cane infetto = cane in cui viene dimostrata la presenza di parassiti tramite metodi diretti o indiretti; (3) cane malato = come regola generale un cane infetto può essere definito "malato" quando manifesta uno o più segni clinici di leishmaniosi sopra riportati o quando presenta alterazioni clinico-patologiche correlabili alla leishmaniosi, anche in assenza di segni manifesti (Castagnaro,2007).

Le alterazioni clinico-patologiche rilevate in corso di leishmaniosi comprendono : anemia non rigenerativa o scarsamente rigenerativa; leucogramma infiammatorio /da stress con neutrofilia-monocitosi e linfopenia-eosinopenia; leucopenia; trombocitopenia; iperfibrinogenemia ; prolungamento di PT e aPTT; iperproteinemia; ipoalbuminemia; iperglobulinemia (per lo più alfa-2 globuline) e alterazione del rapporto albumina / globuline ; gammopatia policlonale /oligoclonale; azotemia con aumento di BUN e creatinina sierica; incremento degli enzimi epatici ; ipostenuria /urine poco concentrate; proteinuria. Diversi studi hanno dimostrato che la valutazione delle alterazioni clinico-patologiche, in associazione ad un attento esame clinico, contribuisce in modo importante nella diagnosi della Leishmaniosi e nel follow-up (Castagnaro,2007)

La diagnosi di leishmaniosi canina viene eseguita per confermare la presenza della malattia nei cani con segni clinici compatibili o anomalie clinico-patologiche, può essere applicata anche per il monitoraggio del soggetto in fase di terapia e follow - up e per lo screening di cani donatori clinicamente sani provenienti da regioni endemiche per evitare la contaminazione delle unità donate (EFSA,2015).

Al giorno d'oggi la diagnosi di questa patologia è piuttosto complicata a causa del possibile uso eccessivo, sottoutilizzo e / o errata interpretazione di alcuni risultati e della mancanza di un gold standard test, ovvero un test dotato di alta sensibilità e specificità, riproducibile, facile da eseguire, a costo contenuto, non invasivo, e in grado di rilevare tutti i cani infetti nella fase iniziale della malattia. E'importante sottolineare che, soprattutto nel caso di *L.*

infantum, in corso di diagnosi si considerano di pari importanza sia l'efficacia del test impiegato che la tipologia del materiale biologico di partenza (Maia,2008; Noli,2014).

Attualmente i principali metodi diagnostici impiegati per la diagnosi di leishmaniosi sono l'esame microscopico da solo /in associazione all'istopatologia, immunoistochimica, test sierologici e analisi molecolare mediante PCR.

L'esame microscopico permette l'osservazione diretta degli amastigoti di *L. infantum* in strisci colorati con Romanovski di campioni di infetti organi / tessuti, (midollo osseo, i linfonodi, pelle, o sangue periferico raramente). Gli amastigoti si possono riscontrare liberi o all'interno di monociti, macrofagi, neutrofili. Il limite principale di questo metodo è rappresentata dall'invasività del campionamento e dalla ridotta sensibilità a causa del numero variabile di cellule infette che può essere prelevato (Maia,2008).

Oltre a ciò la sensibilità di questo metodo è fortemente influenzata da fattori esterni, tra cui la qualità della preparazione, le competenze dell'esaminatore, il tempo dedicato all'osservazione e il numero di campi ottici osservati (Noli,2014).

L'istopatologia viene impiegata per rilevare la presenza di amastigoti in campioni istologici colorati con ematossilina-eosina ricavati da organi infetti, in particolare il linfonodo popliteo risulta essere il più efficace sia in soggetti sintomatici che asintomatici, seguito da milza e midollo osseo. Questo metodo presenta ridotta sensibilità a causa del difficile riconoscimento dei parassiti (Noli,2014).

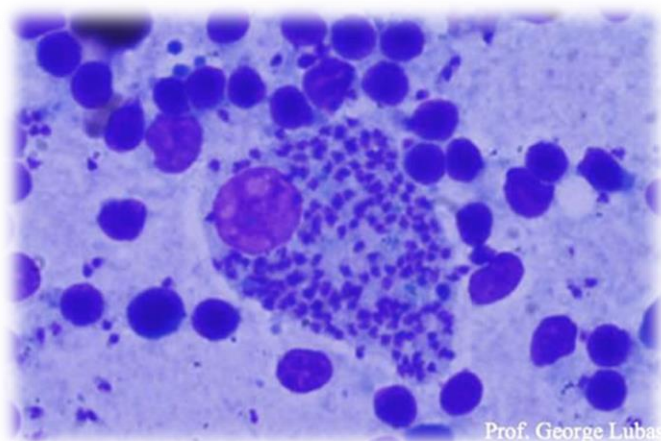


Figura 5 -Macrofago gigante ingolfato di *Leishmania* in striscio da agoinfissione di linfonodo (www.grup-poleishmania.org)

La diagnostica sierologica è comunemente impiegata e si basa sulla ricerca e l'individuazione degli anti corpi IgG anti-*Leishmania* attraverso diversi test di tipo

quantitativo. A tal proposito è importante ricordare che la risposta umorale specifica per la leishmaniosi è di entità importante e presenta livelli molto elevati di immunoglobuline specifiche che aumentano nel corso del tempo; la sieroconversione si verifica in un periodo che va da 1 a 22 mesi (5 in media) per le infezioni naturali (Castagnaro,2007).

La sensibilità di questi test è tipicamente elevata per la presenza di questa massiccia (ma non protettiva) risposta umorale nei soggetti infetti, tuttavia la specificità è inferiore per fenomeni di cross- reattività (Maia,2008; Noli,2014)

I principali test sierologici quantitativi impiegati sono l'IFAT (gold standard) e l'ELISA; è stato recentemente introdotto un kit commerciale rapido di natura immunocromatografica, Leish K ® (BVT Groupe Virbac, La Seyne sur Mer, Francia),rapido, di facile esecuzione ma la performance non è ottimale in termini di sensibilità- specificità (Ferroglia,2007;Solano -Gallego,2009,2011)

Il test IFAT presenta ottima sensibilità e specificità (quasi 100%) e per questo viene considerato il gold standard per la diagnostica sierologica, tuttavia presenta una serie di limiti tra cui scarsa sensibilità nei cani asintomatici che sieroconvertono più tardivamente e l'incapacità di distinguere i soggetti infetti dai soggetti vaccinati (Andrade,2008).

Il riscontro di un elevato titolo anticorpale conferma la diagnosi di Leishmaniosi canina in un soggetto con segni clinici e /o alterazioni clinico-opatologiche compatibili con la malattia (Reis,2005; Solano -Gallego,2011); una titolazione anticorpale debole invece non è necessariamente indicativa di malattia pertanto sono necessari ulteriori accertamenti per confermare o escludere la presenza di Leishmaniosi clinica (Solano -Gallego,2009,2011)

L'analisi molecolare mediante PCR permette di identificare il DNA del patogeno su un vasto numero di materiali biologici (buffy coat, midollo osseo, linfonodo, cute, tampone congiuntivale o sangue intero) (Maia,2008; Solano-Gallego,2011; Noli,2014). La selezione del campione per il saggio PCR è molto importante, perché non tutti i tessuti presentano eguale sensibilità: la biopsia del linfonodo ha alta sensibilità, ma il campionamento potrebbe essere non facile in assenza di linfadenomegalia,, è possibile sostituirla con aspirati midollari ma la raccolta è molto invasiva; la pelle è il tessuto principale di riserva della Leishmania nel cane, pertanto l'uso di biopsie cutanee per l'analisi PCR rivela alta sensibilità in confronto al midollo osseo; molto utile anche l'analisi del tampone congiuntivale ; il sangue intero invece ha una sensibilità ridotta rispetto agli altri campioni. Recentemente, è stato proposto l'uso dei peli come campione considerando i vantaggi rispetto ad altri metodi, vale a dire più semplice raccolta, trasporto e stoccaggio, nonché campionamento non invasivo. I peli infatti sembrano sequestrare e rimuovere una grande

quantità di parassiti, pertanto possono avere grande utilità nella diagnosi di *Leishmania* (Belinchòn-Lorenzo,2012)

La PCR è una tecnica estremamente importante perché dotata di elevata sensibilità e specificità e permette la diagnosi anche nella fase acuta della patologia, tuttavia presenta alcuni limiti, tra cui la possibilità di falsi positivi da contaminazioni o falsi negativi in presenza di limitata presenza del parassita nel campione (Garibyan,2013).

Babesiosi

La babesiosi o piroplasmosi è una patologia clinicamente significativa e geograficamente molto diffusa di mammiferi e uccelli provocata da emo-protozoi appartenenti al genere *Babesia*, che vengono trasmessi dal morso di una zecca dura e sono parassiti intracellulari dei globuli rossi dell'ospite. L'importanza di questa patologia è ampiamente riconosciuta per l'impatto rilevante che ha sulla salute degli animali (Reine,2004; Schoeman,2009; Irwin,2010; Schnittger,2012; Esch,2013 ; Kostro,2015; Wardrop,2016).

I protozoi appartenenti a *Babesia spp.* (Phylum Apicomplexa; Classe Sporozoasida; Famiglia Babesidae) definiti genericamente piroplasmi o piroplasmidi insieme a *Theileria spp.*, vengono considerati i più comuni parassiti del sangue animale dopo i tripanosomi (Gray,2008; Taylor,2010; Schnittger,2012).

Tradizionalmente la morfologia dei protozoi (2 merozoiti piriformi) localizzati all'interno dei globuli rossi è stata impiegata come principale determinante nella classificazione tassonomica. Questa valutazione, realizzata mediante lettura dello striscio ematico al microscopio, ha portato alla distinzione di questi protozoi in grandi babesie (*Babesia canis*) (> 1- 2,5µm) e piccole babesie (*Babesia gibsoni*) (<2,5-5µm). Successivamente l'introduzione delle tecniche molecolari ha permesso di identificare numerose specie di *Babesia* che possono infettare la specie canina, e di conseguenza ha rivoluzionato la tradizionale tassonomia del genere (Schnittger,2012; Solano – Gallego,2016).

La specie Grande Babesia, precedentemente identificata con *Babesia canis*, attualmente comprende 3 specie distinte: *Babesia canis*, *Babesia rossi* e *Babesia vogeli* (Carrett, 1999; Matijatko,2012; Solano – Gallego, 2016).

A causa dell'aspetto morfologico pressochè identico, inizialmente *B.rossi* e *B.vogeli* sono state considerate delle sottospecie di *B.canis*, tuttavia le significative differenze a livello di manifestazioni cliniche, distribuzione geografica e specificità vettoriale attualmente hanno portato a considerarle diversamente (Zahler,1998; Irwin,2009; Solano – Gallego,2011; Matijatko,2012).

Recentemente in North Carolina, USA, è stata descritta un'ulteriore specie di grande Babesia, correlata a *Babesia bigemina*, e definita *Babesia, spp. (Coco)* (Birkenheuer, 2004; Matijatko,2012; Solano – Gallego,2016).

Allo stato attuale sono state descritte solamente tre specie di piccola Babesia di importanza clinica: *B.gibsoni*, *B. conradae* (Kjemtrup,2006 a-b) e *B.vulpes*, recentemente segnalata (Baneth,2015) e precedentemente nominata Babesia “isolata in un cane spagnolo”, *Babesia “microti-simile”*, “*Babesia (Theileria) annae*” e *Babesia cf. microti* (Zahler, 2000; Camacho – Garcia, 2006; Matijatko,2012) sulla base dei loro ospiti naturali e della apparente assenza di uno stadio pre-eritrocitico di infezione nei linfociti. In ogni caso non è stato fissato alcun tipo sia per per “*Theileria annae*” e “*Babesia vulpes*”; pertanto queste denominazioni devono essere considerati come “nomina nuda” e pertanto non disponibili (Solano – Gallego, 2016).

La distribuzione geografica delle varie specie di Babesia è altamente variabile e legata alla presenza della rispettiva zecca vettore responsabile della trasmissione; pertanto non tutte queste specie sono state identificate in Europa. Oltretutto la prevalenza di *Babesia spp.* in Europa è influenzata dalle diverse tecniche diagnostiche impiegate, regione e popolazione analizzate, e specie di babesia ricercata e rilevata. Per quanto riguarda le specie di “grande Babesia” sono state riscontrate solamente *B. Canis* e *B. vogeli*, viene riportato in letteratura un unico isolamento del DNA di *B.rossi*, identificata principalmente in Africa, ancora in attesa di conferma (Fritz,2009; Schnittger,2012;Solano-Gallego,2016). Per quanto riguarda invece le “piccole Babesie” solamente *B.“microti-simile”* e *B.gibsoni* sono state identificate in numerosi paesi europei (Solano – Gallego 2011; 2016).

Diversi fattori sono coinvolti nello sviluppo e nella fuoriuscita dell'infezione tra cui abbondanza sul territorio della zecca vettore competente, percentuale di zecche infette e la specie di Babesia responsabile (Matijatko,2012).

La Babesiosi è fortemente endemica in molti paesi dell'Europa continentale come Francia, Svizzera, Ungheria, Serbia, Croazia ma anche Italia e Spagna Settentrionali, l'ultimo decennio ha documentato una chiara espansione della malattia in zone dove tradizionalmente era poco comune come Paesi Bassi, Belgio, Germania e Polonia. La presenza di portatori cronici subclinici difficilmente rilevabili, l'inabilità di eradicare completamente l'infezione e la trasmissione transovarica nelle zecche permettono il mantenimento dell'infezione nei territori (Boozer,2003; Beugnet,2009).

Nello specifico vedi tabella (Solano- Gallego,2016).

Specie	Distribuzione geografica	Vettore	Dimensioni approssimate in uno striscio di sangue (µm)
<i>Babesia canis</i>	Presente nella maggior parte del territorio Europeo (dal Portogallo al Nord-Est del continente) soprattutto nelle zone a clima fresco e umido. Prevalenza elevata nel Centro Europa, ridotta invece nel bacino del Mediterraneo. L'incidenza media varia dall'1% al 16% nelle zone maggiormente interessate, 2,3% in Italia	<i>Dermacentor reticulatus</i>	2.5 x 4.5
<i>Babesia vogeli</i>	Albania, Croazia, Francia, Grecia, Italia, Portogallo, Romania, Serbia, Slovenia, Spagna and Turchia . Prevalenza variabile da 0,9% in Francia al 1,3% in Slovenia	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2.5 x 4.5
<i>Babesia gibsoni</i>	Croazia, Germania, Italia, Serbia, Slovacchia, Spagna e Regno Unito	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1 x 3
<i>Babesia "microti-like" sp.</i>	Croazia, Francia, Italia, Portogallo, Serbia, Spagna, e Svezia	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>Ixodes canisuga</i>	1 x 2.5

Tabella 2.- Distribuzione geografica ,vettori pertinenti e dimensioni previste di *Babesia* spp. nello striscio di sangue - Geographical distribution, relevant vectors, and the expected size of *Babesia* spp. in blood smears. Data for the primary *Babesia* species found in Europe provided (Solano – Gallego,2016).

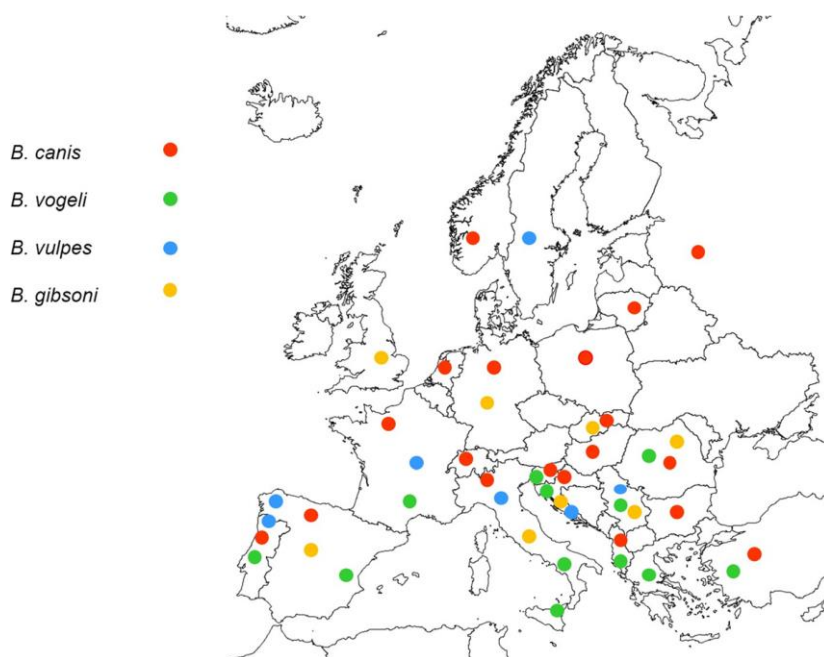


Figura 5.1 - La distribuzione delle specie di *Babesia* canina in Europa nei cani basata principalmente su analisi molecolari. Da notare la presenza di *B. canis* e *B. "microti-like"* principalmente nelle zone fredde del Centro-Nord Europa, mentre l'infestazione da *B. vogeli* è localizzata principalmente nel Bacino del Mediterraneo - The distribution of canine *Babesia* species in Europe in dogs based mainly on molecular analysis. Note the presence of *B. canis* and *B. microti-like* sp. mostly in the cooler climate zones of north and central Europe while infection with *B. vogeli* is mainly around the Mediterranean basin. The references for each country are included in the reference list. Figure updated from Solano-Gallego & Baneth (Solano – Gallego, 2011).

Il vettore pertinente per la trasmissione di *B. canis* è *Dermacentor reticulatus*, una zecca dura che è abbastanza diffusa sul territorio europeo ma predilige le zone a clima freddo e umido, soprattutto nel Centro Europa (Boozer, 2003; Schoeman, 2009; Petney, 2012; Solano – Gallego, 2016). La distribuzione geografica di questa zecca è in estensione, recentemente è stata isolata in alcune zone a latitudini inferiori dal Portogallo alla Polonia (Mierzejewska, 2016; Solano -Gallego, 2016).

Gli adulti di questa zecca sono attivi principalmente durante i mesi invernali, da Ottobre sino anche a Marzo se l'inverno non è troppo rigido (Rubel, 2014).

Studi hanno dimostrato che *R. sanguineus* è responsabile della trasmissione di una specie di babesia in grado di infettare il cane, *B. vogeli* (Zahler, 1998; Boozer, 2003; Schoeman, 2009; Solano -Gallego, 2016).

Come già dettagliatamente descritto in precedenza *R. sanguineus* è diffusa prevalentemente nelle zone Mediterranee a clima temperato ma, grazie alla sua elevata adattabilità e all'endofilia, sta diventando tollerante anche al clima più freddo e si sta estendendo alle regioni Centrali dell'Europa e alle isole britanniche. Ha contribuito alla sua estensione

geografica verso nord anche l'introduzione, in quelle zone, di cani infestati provenienti dal Mediterraneo (Irwin,2010; Solano – Gallego,2016).

R.sanguineus può servire come potenziale vettore per *B.gibsoni* in Europa (Solano-Gallego,2016).

I dettagli del ciclo biologico di *B. "microti-simile"* spp. sono ancora ampiamente sconosciuti, il suo DNA è stato riscontrato all'interno di *I.ricinus*, *I. hexagonus* e *I. canisuga*, tuttavia non esistono allo stato attuale evidenze scientifiche del loro ruolo di vettori competenti per questa specie di babesia (Camacho,2003; Lobetti,2006; Schoeman,2009; Miro,2015; Solano – Gallego,2016).

Per quanto riguarda il ciclo biologico, durante il pasto di sangue la zecca infetta un ospite mammifero con gli sporozoiti che invadono i globuli rossi dell'ospite, diventando "piroplasmii", e lì iniziano a riprodursi in modo asessuato per scissione binaria asincrona, dando vita a due (talvolta 4) merozoiti a forma di "pera", in realtà non sempre rispettata a causa di un elevato pleomorfismo del protozoo. La localizzazione e le dimensioni dei merozoiti differiscono tra le specie di Babesia e le specie di ospite in causa. Nelle specie appartenenti alle grandi babesie i merozoiti sono più grandi rispetto al raggio dei merozoiti, più piccolo invece nelle specie di piccole Babesie. Le cellule figlie lasciano la cellula ospite, provocandone emolisi, e continuano ad infettarne a catena; questo tipo di riproduzione si protrae fino alla morte dell'ospite o, più comunemente, fino all'intervento del sistema immunitario. Nelle forme croniche infatti i parassiti vengono sequestrati all'interno del letto capillare della milza, del fegato e di altri organi e da lì vengono rilasciati in circolo a cadenza intermittente. Se all'interno di ospiti reservoir competenti si sviluppano i gameti maschili e femminili; le specie zoonotiche di Babesia hanno diversi ospiti reservoir quali topi bianchi, bovino, ruminanti selvatici, canidi, toporagni. Nel momento in cui una zecca si nutre su ospite reservoir i gameti (macro e microgameti) presenti nel sangue arrivano nell'intestino, lì vengono fecondati (gametogonia) e diventano zigoti. Gli zigoti si moltiplicano per fusione multipla e, mediante divisione meiotica, si trasformano in una forma mobile definita ookinete che migra nelle ghiandole salivari, per iniziare il ciclo sporogonico da cui originano gli sporozoiti infettanti (Uilenberg,2006;Irwin,2010; Gohils,2010; Taylor,2010; Gray,2010; Schnittger,2012; Esch,2013; Kostro,2015).

Prima di entrare nelle ghiandole salivari, *Babesia spp.* migra nelle ovaie della zecca, determinando la trasmissione transovarica e quindi il mantenimento dell'infezione nelle generazioni successive di zecche; alcune specie di Babesia possono persistere in diverse generazioni di zecche, anche senza nuove infezioni. Gli sporozoiti sono capaci di

mantenersi vitali anche durante le mute dell'artropode , consentendo l'infezione in animali ricettivi durante il pasto di sangue della zecca (trasmissione transtadiale). La trasmissione transtadiale può verificarsi inoltre quando le larve e le ninfe si alimentano su animali infetti e trasmettono le forme infettanti nello stadio successivo dopo lo sviluppo gametogonio e sporogonico (Uilenberg,2006 ; Taylor,2010; Irwin,2010; Esch,2013).

E' importante ricordare che la zecca vettore non è subito infettante a partire dal momento dell'attacco, ma solo dopo qualche giorno perché gli sporozoiti devono poter maturare per poter infettare l'ospite (Uilenberg,2006; Irwin,2010).

La trasmissione del patogeno mediante trasfusione è stata recentemente documentata sia nel cane che nell'uomo, legata alla presenza dei merozoiti circolanti nel sangue periferico (Wardrop,2016; Solano -Gallego,2016).

Per *B.gibsoni* è stata dimostrata anche la trasmissione verticale (Stegeman, 2003; Fukumoto,2005; Solano -Gallego,2016) o per contatto diretto mediante morsi (cani da combattimento), saliva o ingestione di sangue (Schoeman,2009; Yeagley,2009; Solano -Gallego,2016).

Quest'ultimo aspetto è stato ben documentato nelle razze tipicamente impiegate per i combattimenti come American Pitt Bull Staffordshire Terrier e Tosa Inu. Vi è ormai l'evidenza epidemiologica che i cani da combattimento rappresentano un ulteriore mezzo di trasmissione del parassita, e ciò implica che qualsiasi cane in qualsiasi paese può teoricamente essere un portatore e qualsiasi episodio all'anamnesi di scontro con un altro cane con abbondante sanguinamento rappresenta un fattore di rischio (Irwin,2010).

E' stata riportata recentemente in letteratura la prima evidenza clinica di trasmissione verticale anche per *B.canis* e *B. "microti-simile" spp.* (Simoes,2011; Mierzejewska,2014; Solano -Gallego,2016).

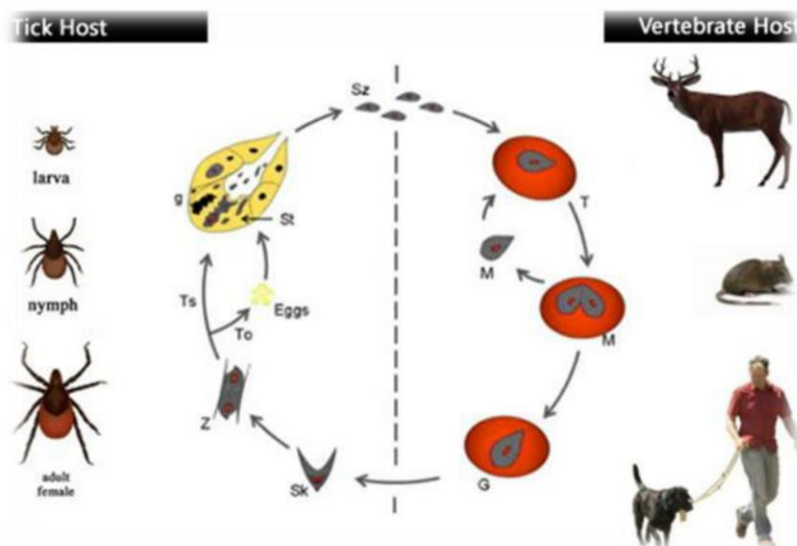


Figura 5.2 Ciclo biologico generico di *Babesia* spp. - Generic life cycle of *Babesia* spp (Kostro,2015).

E' importante sottolineare che nessuna tra le specie di *Babesia* del cane/gatto sembra avere rilevanza zoonotica (Solano -Gallego,2016).

Per quanto riguarda i fattori predisponenti : (1) uno studio ungherese ha rilevato una maggiore sensibilità all'infezione da *B.canis* nel Pastore Tedesco e nel Komondor (Solano – Gallego,2016), la predisposizione di altre razze all'infezione da *B.canis*, *B.vogeli*, *B.gibsoni* e *B.rossi* è stata segnalata a latitudini diverse (Birkenheuer,2005; Solano – Gallego,2016) ; (2) le femmine intere presentano un minore rischio di contrarre infezione da *B.rossi* rispetto alle femmine sterilizzate e anche rispetto ai maschi, sia interi che sterilizzati anche se il meccanismo alla base non è stato completamente delucidato (Solano -Gallego,2016) ; (3) i soggetti più giovani tendono a manifestare la malattia in modo più grave in caso di infezione da *B.canis*, *B.vogeli* o *B.rossi* (Solano – Gallego, 2008,2011,2016) ; analogamente è stato riportato che i cani da caccia anziani infestati da *B. "microti-simile" spp.* presentano un rischio maggiore di sviluppare azotemia (Camacho,2004; Solano -Gallego,2016).

Il periodo di incubazione della babesiosi canina varia da 10 a 21 giorni per *B.canis*, 14-28 giorni per *B.gibsoni* (Boozer,2003; Schoeman,2009).

Le manifestazioni cliniche riscontrate in corso di Babesiosi possono variare notevolmente, dall'infezione subclinica alla sindrome da disfunzione multiorgano potenzialmente fatale (Irwin,2010; Solano – Gallego,2016). L'ampia varietà delle manifestazioni cliniche dipende molto anche dalla specie di *Babesia* responsabile dell'infezione e altri fattori concomitanti che possono influire sulla capacità di resistenza dell'organismo e, di

conseguenza, sulla gravità della malattia: età, splenectomia, immunocompetenza, concomitanti infezioni o patologie (Irwin,2009,2010; Solano -Gallego,2011,2016).

Per *B.rossi* è stata inoltre dimostrata una correlazione tra gravità della malattia e carica parassitaria, non confermata nelle altre specie ; uno studio recente ha evidenziato che non ci sono differenze sostanziali in termini di carica parassitaria tra cani sopravvissuti e non sopravvissuti all'infezione da *B.canis* (Bohm,2006; Solano-Gallego,2016).

Sono state descritte differenze in termini di virulenza tra le varie specie di Babesia che infettano il cane : tra le “grandi Babesie” *B.vogeli* è la specie meno patogena, almeno per i cani adulti (può essere letale nei cuccioli di 3-4 mesi), mentre *B.rossi* viene considerata la più virulenta (riscontrata solamente in Africa). L'infezione con *B.rossi* provoca anemia emolitica e può comportare gravi complicazioni come lesioni neurologiche, insufficienza renale acuta e edema polmonare, con una prognosi infausta. *B.canis* presenta una patogenicità piuttosto variabile e virulenza intermedia tra *B.vogeli* e *B.rossi*. La patogenicità delle “piccole Babesie”, come *B.gibsoni* o *B.-“microti-simile”* spp. varia da moderata a grave (Schoeman,2009; Irwin,1991,2009,2010; Penzhorn,2011; Schnittger,2012; Solano – Gallego,2011, 2016).

Le differenze tra le manifestazioni cliniche della malattia riflettono le differenze tra le varie specie di Babesia; anche all'interno della stessa specie *B.canis* sono presenti delle differenze genetiche a livello del gene 18srDNA, che hanno portato alla sua ulteriore suddivisione in due ceppi principali, Bc28-A and -B .Queste differenze si ripercuotono su più fronti, soprattutto a livello di virulenza e permettono così di spiegare le diverse manifestazioni nei cani affetti, ad esempio in termini di anemia e trombocitopenia (Bourdoiseau,2006; Matijatko,2012; Kostro,2015).

Uno studio realizzato in Italia sulle manifestazioni dell'infezione e da *B.canis* ha riportato anemia nella maggior parte dei casi analizzati, trombocitopenia in tutti (Furlanello.2005; Schoeman,2009).

Nonostante le marcate differenze legate alle varie specie di Babesia che infettano il cane, in corso di babesiosi vi sono numerosi segni clinici e alterazioni clinico-patologiche comuni: febbre (primo sintomo a comparire) apatia, debolezza, anoressia, pallore generale delle mucose,linfadenomegalia e splenomegalia, anemia, trombocitopenia, varie alterazioni leucocitarie, ittero, vario grado di pigmenturia (emoglobinuria e bilirubinuria), ipoalbuminemia e iperbilirubinemia. La trombocitopenia varia da moderata a grave, come l'anemia; nonostante sia il segno caratteristico della patologia, è abbastanza raro il riscontro di petecchie o ecchimosi,così come sono infrequenti segni di evidente coagulopatia, tranne

che in presenza di DIC o di co-infezione con altri patogeni come *E.canis*. Uno studio realizzato in Giappone sull'infezione subclinica da *B.gibsoni* in cani da combattimento ha rilevato una conta piastrinica molto ridotta e titoli significativamente alti di IgG anti-piastrine nei soggetti PCR-positivi (Matsuu,2004; Furlanello,2005; Schoeman,2009; Taylor,2010; Irwin,2009,2010; Schnittger,2012; Kostro,2015; Solano – Gallego,2016).

E' importante sottolineare che nella maggior parte dei casi la trombocitopenia precede l'insorgenza dell'anemia e della parassitemia (Schoeman,2009).

In base alla specie infettante e al decorso dell'infezione l'anemia può essere rigenerativa o non rigenerativa (più frequentemente associata a *B.canis*) ed è determinata da meccanismi di emolisi sia intra- che extra-vascolare frutto del danno provocato dalla presenza intracellulare del parassita e dalla conseguente rottura eritrocitaria. In realtà la gravità dell'anemia in corso di babesiosi non è proporzionale all'entità della parassitemia che, nella fase acuta dell'infezione, in genere rimane abbastanza bassa, pertanto, oltre al danno diretto indotto dal parassita sono stati proposti altri meccanismi, alla base dell'emolisi degli eritrociti infetti: danno ossidativo provocato da determinate tossine emolitiche (Otsuka,2002; Kumar,2006; Chaudhuri,2008; Irwin,2010) ; aumentata fragilità osmotica; emodiluizione; sequestro splenico; processi immunomediati II con emolisi immunomediata ed eritrofagocitosi; alterata inadeguata eritropoiesi(Boozer,2003; Jacobson,et al., 2006;Schoeman,2009; Matijatko,et al., 2012; Solano – Gallego,et al., 2008; 2016).

Numerosi studi hanno dimostrato che, in corso di babesiosi canina, l'anemia non è proporzionale alla parassitemia in quanto il processo distruttivo coinvolge eritrociti parassitati ma anche sani (Murase,1990 ; Jacobson,1996; Furlanello,2005;Matijatko,2012). Molte similitudini sono state evidenziate tra il quadro ematologico della babesiosi canina e l'anemia emolitica immunomediata : presenza di autoagglutinazione,sferocitosi e, molto frequentemente, positività al test di Coombs (Inokuma,2005;Schoeman,2009; Irwin,2010). Possono comparire, inoltre molti altri segni clinici che non sono direttamente correlati all'emolisi indotta dal parassita, ma riflettono il risentimento sistemico dell'organismo (stato di SIRS) e la disfunzione degli altri organi (MODS) legate all'instaurarsi di una importante risposta infiammatoria nell'ospite: dimagrimento; nefropatia acuta o cronica; glomerulonefrite; disordini coagulativi (DIC); epatopatia con ittero marcato ; emolisi o trombocitopenia immuno-mediata ; emoconcentrazione ; shock ipotensivo; alcalosi e /o acidosi metabolica e /o respiratoria ; disordini gastro-intestinali (vomito o diarrea) ; pancreatite; ascite; lesioni oculari (uveite o cecità); mialgia; rabdomiolisi; danni cerebrali con disturbi locomotori, paresi o episodi epilettiformi ; problemi respiratori come edema o

distress respiratorio acuto (ARDS) (Boozer,2003; Nel,2004; Jacobson,2006; Schoeman,2009; Taylor,2010; Matijatko,2007,2012 ; Kostro,2015; Solano -Gallego,2016). Le alterazioni clinico-patologiche includono principalmente: ipoglicemia, disturbi acido - basici, azotemia, incremento degli enzimi epatici e delle proteine della fase acuta (Nel,2004; Matijatko,2007; Irwin,2010) responsabili dello stato di infiammazione sistemica che alla lunga provoca la MODS (Jacobson,2006).

Il livello della proteina C reattiva (CRP) è elevato nei cani affetti da babesiosi, in molto studi è stata sottolineata la sua funzione come interessante marker nel monitoraggio della risposta al trattamento (Matijatko,2007; Irwin,2010), un altro studio realizzato invece in Sudafrica non ha rilevato particolare valore prognostico di questo parametro (Irwin,2010). Alcune tra queste alterazioni, come l'ipoglicemia (<59.4 mg/dL) al momento del ricovero, l'iperlattatemia persistente (>22.5 mg/dL) e l' azotemia (elevato valore della creatinina sierica) sono state associate a prognosi infausta e maggiore incidenza di mortalità (Welzl,2001; Nel,2004; Camacho,2004; Irwin,2010)

Questa forma complicata di babesiosi nella maggior parte dei casi è stata riportata in Africa e associata all'infezione da *B.rossi*, specie maggiormente virulenta, tuttavia viene riportata con maggiore intensità negli ultimi anni anche in Europa in associazione a gravi forme di Babesiosi (Matijatko,2009; Schetters,2009; Irwin,2010).

Le differenze nella manifestazione clinica della babesiosi dipendono sostanzialmente dall'interazione tra parassita e ospite : se l'organismo animale risponde rapidamente all'infezione mediante una importante produzione di citochine infiammatorie, il parassita viene rapidamente messo sotto controllo, se invece la risposta pro-infiammatoria dell'ospite è inadeguata il parassita non solo sopravvive ma continua a stimolarla determinando, alla lunga e in assenza di un meccanismo anti-infiammatorio controbilanciante in grado di disinnescarla, danni progressivi a organi e tessuti sino al quadro clinico di MODS.I soggetti "portatori" affetti in modo cronico in genere non presentano alcun segno clinico come conseguenza dell'instaurarsi di una risposta immunitaria o del fenomeno della tolleranza immunologica, tranne che in condizioni di peggioramento dello stato di salute, ad esempio trattamento immunosoppressivo, splenectomia o qualsiasi situazione inficiante sul sistema immunitario del soggetto ad es. stress post chirurgico o malattie debilitanti). In queste condizioni infatti il sistema immunitario non riesce ad eliminare l'infezione che, quindi, attecchisce con maggior gravità (Irwin,2009 ; Solano -Gallego,2011,2016).

I meccanismi che permettono all'organismo di eludere il sistema immunitario e persistere all'interno degli eritrociti sono stati identificati, ad esempio, subito dopo l'introduzione nel circolo dell'ospite, l'ingresso dei merozoiti all'interno dei globuli rossi permette di evitare il complemento e gli altri meccanismi dell'immunità innata (Esch,2013).

L'invasione cellulare e l'instaurarsi dell'infezione dipendono fortemente dalla suscettibilità individuale, a sua volta legata a diversi fattori tra cui la razza: studi sperimentali hanno dimostrato una base genetica della suscettibilità /resistenza al patogeno (Esch,2013).

I meccanismi immunitari un corso di infezione primaria sono principalmente di tipo innato: l'attivazione dei macrofagi, inclusi quelli splenici, e una marcata risposta pro-infiammatoria precoce sono necessari per la clearance parassitaria e la prevenzione della patologia clinica (Li Yi, 2012 ; Esch,2013).

Ciò è molto importante perché permette di spiegare la maggior sensibilità nei soggetti splenectomizzati o immunodepressi, di individuare l'origine delle differenze razziali – individuali in diverse citochine infiammatorie e di spiegare la relativa resistenza degli animali giovani all' infezione: gli animali giovani presentano picco di produzione di IL-2 e IFN – γ 3 giorni prima rispetto agli adulti (Goff, 2001 ; Esch,2013).

Successivamente intervengono l'immunità cellulo-mediata (in quanto parassita intracellulare) e la produzione di anticorpi, soprattutto IgM, IgG1 e IgG2; gli anticorpi Babesia - specifici attaccano le proteine di superficie degli stadi eritrocitari e sono coinvolti nell'opsonizzazione dei globuli rossi parassitati (Kostro,2015).

Il modello teorico delle cellule e delle molecole coinvolte nella risposta immunitaria contro Babesia prevede tre fasi : (1) fase di instaurazione con produzione di anticorpi IgG che impediscono l'attacco dei parassiti liberi agli eritrociti ; (2) fase di progressione in cui intervengono le cellule del sistema immunitario innato a controllare il tasso di replicazione dei merozoiti mediante il rilascio di fattori solubili ad azione inibitoria quali IFN- γ (ad opera delle cellule NK), TNF- α , Ossido Nitrico (NO) e ROS (ad opera dei macrofagi) ; (3) fase di risoluzione in cui i linfociti T CD4+ attuano la clearance parassitaria (Kostro,2015). Babesia produce diversi antigeni eritrocitari di superficie, tra cui i VESA, che vengono trasportati fino alla superficie degli eritrociti e determinano l'adesione alle cellule endoteliali dei piccoli vasi (Gohil, 2010 ; Esch,2013).

Questo contribuisce all'attività di sequestro delle emazie infette nella microcircolazione periferica e al loro allontanamento ad opera della milza (sequestro) (Matijatko,2012; Esch,2013).

I casi di co-infezione con varie *Babesia spp.* sono riportati molto raramente nel cane, tuttavia analisi filogenetiche e di sequenziamento molecolare suggeriscono che vi può essere una grande diversità tra le specie di piroplasmici che possono co-infettare il cane (Zahler,2000; Beck,2009; Solano -Gallego,2016).

La co-infezione con altri agenti patogeni non è comune e difficilmente viene registrata (Miro,2015; Solano-Gallego,2016), solamente nelle aree endemiche è possibile trovare cani co-infettati da altri patogeni di specie diversa come *Leishmania spp.*, *Ehrlichia /Anaplasma spp.*, *Hepatozoon spp.*, in relazione alla localizzazione geografica e alla distribuzione dei competenti vettori artropodi (Miro,2013; Solano -Gallego,2015,2016).

La diagnosi di babesiosi avviene mediante lettura dello striscio ematico mediante microscopia diretta, IFAT e PCR. La lettura dello striscio ematico, colorato con Giemsa o Diff Quick rappresenta un utile strumento diagnostico per la babesiosi clinica nel cane e tutt'ora rappresenta il metodo più facile ed accessibile per molti Veterinari, tuttavia ha una sensibilità molto inferiore rispetto all'analisi PCR ed è piuttosto dipendente dalla specie infettante: questo test ha infatti elevata specificità per la diagnosi delle specie di "grande Babesia" (ad es. *B.canis*, meno per *B.gibsoni*), presenta invece scarsa -moderata sensibilità per la diagnosi delle specie di "piccole Babesie" (ad es. *B.gibsoni* o *B. "microti-simile"*) in quanto molto difficili da riuscire a vedere senza adeguata esperienza, anche perché molto spesso in corso di anemia i globuli rossi presentano vacuolizzazioni e picchettature (Schoeman,2009; Solano -Gallego,2008, 2011,2015,2016 ; Miro,2015)

Oltre a ciò l'osservazione morfologica non consente l'identificazione della specie di Babesia presente. La lettura dello striscio ematico, pertanto, deve essere considerato come un primo step del processo diagnostico ed è necessario la rivalutazione dei campioni risultati negativi alla lettura dello striscio mediante PCR su sangue o tessuto splenico.

La letteratura raccomanda l'utilizzo di sangue fresco per lo striscio; sottolinea inoltre come l'osservazione delle grandi Babesie sia molto più facile nel sangue capillare (ad es. prelevato da un orecchio o in prossimità delle unghie) per l'elevata concentrazione di parassiti (Bohm,2006; Irwin,2009 ; Solano -Gallego,2016).

Il limite di rilevazione dei parassiti in un uno striscio ematico sottile corrisponde ad una parassitemia dello 0,5% (Bohm,2006 ; Solano – Gallego,2016). Pertanto il rilevamento di forme croniche o subcliniche in soggetti portatori richiede necessariamente il ricorso alle tecniche molecolari , in quanto la sensibilità della lettura microscopica dello striscio è molto bassa.

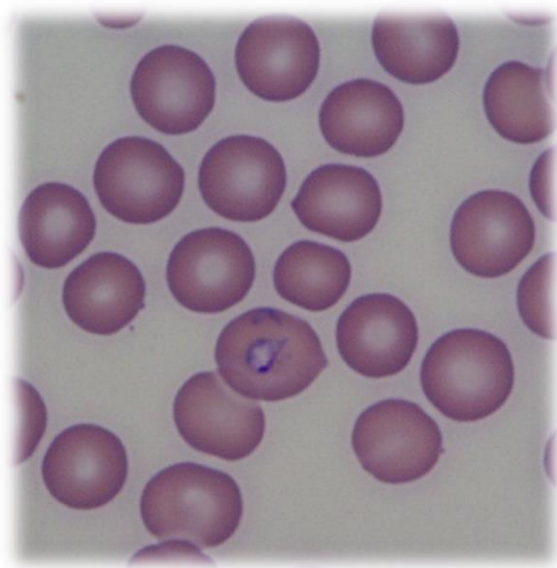


Figura 5.2 Microfotografia mostrante una specie di “ Grande Babesia” (B.canis) in un eritrocita canino – Photomicrograph showing a large- sized Babesia Spp. (B.canis) in a canine erythrocytes. Scale bar 10μ

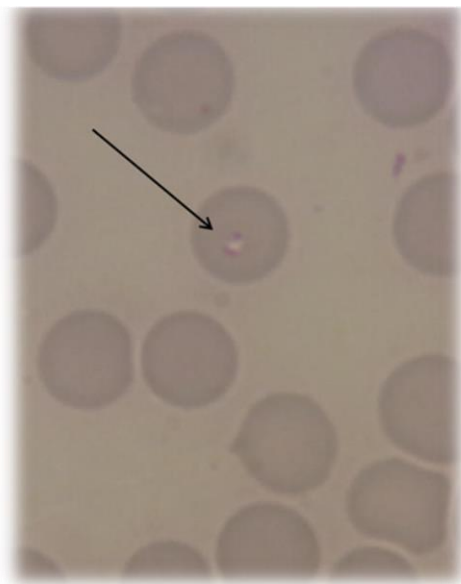


Figura 5.3 Microfotografia di una piccola Babesia (B.microti simile spp.) in eritrocita canino – Photomicrograph of Small Babesia (B.microti- like spp..) in canine erythrocytes- Scale bar 10μ

La sierologia può essere impiegata mediante tecniche quantitative come l'immunofluorescenza indiretta (IFAT) o saggio immuno-assorbente legato ad un enzima (ELISA), che permettono di determinare e quantificare il titolo anticorpale presente nell'organismo. Allo stato attuale non esistono kit commerciali rapidi per Babesia ma bisogna ricorrere a laboratori specialistici, anche se esistessero fornirebbero solo indicazioni sulla presenza o meno di anticorpi anti-Babesia senza quantificazione, dunque con minor sensibilità e specificità (Sainz,2015; Solano-Gallego,2016).

Un altro problema della diagnostica sierologica risiede nel fatto che ancora non è stato sviluppato un antigene universale, il più utilizzato sia nella pratica clinica che nella ricerca è ancora quello di *B.canis*. Inoltre specificità e sensibilità di queste tecniche non sono state stabilite in modo preciso (Solano – Gallego,2011,2016).

L'interpretazione di una positività sierologica è piuttosto complicata a causa della cross-reattività tra le varie specie di Babesia, soprattutto quelle maggiormente correlate filogeneticamente, ad es. tra *B.canis* e *B.vogeli* (in realtà può verificarsi anche tra grandi e piccole Babesie) ; per questo motivo il risultato positivo indica l'avvenuto contatto, presente o passato, con il parassita ma non permette di individuare la specie infettante (Solano – Gallego,2016).

L'indagine sierologica può dare frequentemente falsi negativi: non è raro infatti che un cane risulti sieronegativo ma sia infetto da Babesia. Questo accade perché la babesiosi si manifesta in modo acuto, pertanto le 3 -4 settimane successive in attesa di avere la produzione anticorpale, rappresentano un periodo di negatività sierologica. In generale, infatti, il livello anticorpi circolanti inizia ad aumentare 3 settimane dopo l'inizio del trattamento e decade gradualmente sino ad approssimativamente 160 giorni (Solano-Gallego,2016).

La sieroconversione può essere sfruttata per confermare un'infezione acuta da *Babesia spp.* In questi casi si dovrebbe eseguire una sierologia quantitativa non appena il paziente presenta segni clinici /alterazioni clinico -patologiche e un'altra dopo 4-8 settimane: la presenza di una titolazione anticorpale medio-alta durante la fase di convalescenza (corrispondente alle 3-4 settimane successive) può confermare l'infezione da parte di Babesia al tempo della presentazione. Tuttavia non è una tecnica comunemente impiegata nella pratica clinica (Solano-Gallego, 2011; Miro,2015; Solano – Gallego,2016).

La sierologia risulta inoltre piuttosto utile per individuare, in via retrospettiva, un'infezione cronica presente da tempo (fino a 420 giorni dall'infezione) non rilevabile mediante PCR (falsi negativi) a causa del sequestro e dell'eliminazione del parassita dal circolo ad opera delle difese dell'organismo (Solano – Gallego,2016).

L'analisi molecolare mediante PCR è uno strumento molto importante nella diagnosi della babesiosi per quattro motivi principali : (1) sensibilità molto elevata (soprattutto rispetto alla lettura dello striscio ematico) ; (2) il riscontro del DNA di un patogeno specifico in contesto clinico può essere considerato la prova di un'infezione attiva e in corso ; (3) la PCR permette, a differenza delle tecniche precedenti, l'identificazione precisa della specie responsabile dell'infezione e,di conseguenza, la formulazione di una prognosi più accurata

; (4) la PCR può risultare utile nel monitoraggio del trattamento. L'analisi PCR deve essere eseguita su sangue periferico in EDTA (Birkenheuer,2004; Solano - Gallego,2016).

La PCR, nonostante la sua elevata sensibilità, può dare dei risultati falsi negativi: in letteratura sono riportati dei casi di falsi negativi di casi di infezione cronica da *B.gibsoni* attribuiti all'eliminazione del patogeno dal circolo. E' importante tener presente questo limite nel momento in cui si effettua lo screening di soggetti potenziali portatori e altri soggetti asintomatici in qualità di donatori di sangue (Irwin,2010; Miro,2015; Solano – Gallego,2016).

I problemi principali legati all'impiego della tecnica PCR nella pratica clinica sono legati essenzialmente ai costi elevati (Solano – Gallego,2016)

Hepatozoonosi

Hepatozoon spp. comprende parassiti Apicomplexa (Classe Sporozoasida, Famiglia Hepatozoideae) filogeneticamente correlati ai piroplasmi e agli emosporidi (Barta,2001; Baneth,2003; Ivanov,2008; Taylor,2010; Baneth,2011).

Uno studio di revisione globale sul genere *Hepatozoon*, pubblicato nel 1996, ha descritto 312 specie di *Hepatozoon*; da allora 24 nuove specie sono state descritte o ri-classificate come *Hepatozoon* (Baneth,2011).

Tra tutte le specie attualmente riconosciute, solamente due sono state identificate come patogeni del cane, in cui determinano due patologie distinte: (1) *H.canis*, diffuso prevalentemente in Asia, Africa, Europa del Sud e Sud America e recentemente identificato anche negli USA ; (2) *H. americanum*, localizzato principalmente nella parte Sud -Est degli Stati Uniti (Baneth,2011).

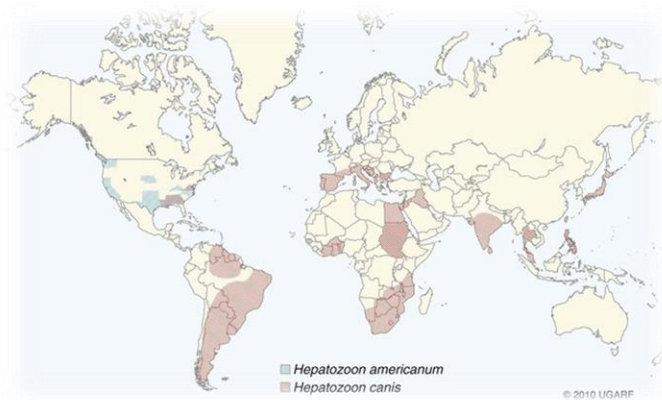


Figura 5.4 - Mappa della distribuzione geografica riconosciuta di *H. canis* e *H. americanum* - Map of the reported geographic distributions of *H. canis* and *H. americanum*. (www.veteriankey.com) (Art by Thel Melton © 2010 University of Georgia Research Foundation Inc.)

H. canis è un protozoo parassita del sangue, fegato, reni di cane e canidi selvatici, responsabile di una patologia definita epatozoonosi canina; viene riscontrato principalmente nelle regioni tropicali, subtropicali e temperate, in particolare Asia, Africa, Sud America e Bacino del Mediterraneo, ma si sta diffondendo anche a latitudini più elevate, ad esempio in Germania, principalmente a conseguenza dei cambiamenti climatici ma anche delle maggiori movimentazioni degli animali domestici (Baneth, 2007; Ivanov, 2008; Taylor, 2010; Baneth, 2011).

H. canis, come le altre specie di *Hepatozoon*, è un parassita dixeno con un ciclo biologico che prevede sviluppo sessuale e sporogonia (riproduzione sessuata) all'interno di un invertebrato ematofago che rappresenta l'ospite definitivo, e merogonia seguita da gametogonia (riproduzione assessuata) nell'ospite intermedio vertebrato. *R. sanguineus* è l'ospite definitivo principale di *H. canis*, tuttavia è stato dimostrato che altre specie di zecche possono essere coinvolte nel ciclo del protozoo; l'ospite intermedio è rappresentato principalmente dal cane, tuttavia l'infestazione è stata riportata anche in canidi selvatici e altre specie carnivore. (Ivanov, 2008; Taylor, 2010; Baneth, 2011).

H. canis è probabilmente uno tra i patogeni responsabili di CVBDs maggiormente diffuso al mondo per il suo stretto legame biologico con *R. sanguineus* e la distribuzione cosmopolita di tale zecca (Ivanov, 2008; Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres, 2010; Otranto, 2011).

Da un punto di vista epidemiologico non è stata evidenziata alcuna predilizione di razza, sesso o età (dai cuccioli di 3 mesi sino a cani anziani); la maggior parte dei soggetti interessati proviene da ambiente di tipo rurale, principalmente per una maggiore

esposizione alle zecche. I casi di infezione sono concentrati soprattutto durante i mesi più caldi dell'anno, periodo di massima attività dei vettori responsabili; uno studio realizzato in Israele ha dimostrato un'incidenza più elevata di casi nel periodo tra Maggio e Novembre. Un altro lavoro giapponese ha indicato il picco della parassitemia tra la primavera e l'autunno. E' tuttavia importante sottolineare che l'epatozoonosi può essere diagnosticata anche durante il periodo invernale, ovvero quando l'attività di trasmissione vettoriale è minima, a causa della persistenza cronica dell'infezione (Ivanov,2008; www.veteriankey.com)

Gli stadi ninfali della zecca che si alimentano su cani infetti ingeriscono, mediante il pasto di sangue, leucociti o meglio i neutrofili circolanti parassitati dai gamonti (forma ellissoide e avvolti da spessa membrana). Nell'intestino della zecca i gamonti si liberano dai neutrofili e mutano in gameti maschili e femminili che, a loro volta, danno luogo a zigoti e oocisti. Ogni oocista matura contiene numerose sporocisti con un numero variabile di sporozoiti da 10 a 26. Dopo la muta della zecca le oocisti si rinvergono nell'emocele ed ognuna può essere portatrice di migliaia di sporozoiti infettanti. Il cane si infetta ingerendo la zecca contenente gli sporozoiti infettanti che, una volta nell'intestino, si liberano, penetrano la parete intestinale e vengono trasportati ad organi e tessuti target attraverso sangue e linfa. I primi organi ad essere colonizzati sono milza, linfonodi e midollo osseo in cui, a livello di macrofagi e cellule endoteliali, avviene la schizogonia. Seguono altri organi come fegato, reni e polmoni. Nei tessuti infetti si possono trovare due tipi di schizonti: (1) schizonte contenente 2-4 macromerozoiti; (2) schizonte contenente 20 micromerozoiti allungati, che si trovano allineati all'interno di una struttura circolare a formare una struttura cistica dall'aspetto caratteristico a "ruota raggiata". Lo schizonte, una volta giunto a maturazione, si rompe e rilascia i merozoiti che invadono i neutrofili circolanti, dove si sviluppano, mediante processo di gametogonia, in gamonti che passano nel circolo periferico. In alternativa i macromerozoiti possono produrre schizonti secondari all'interno dei tessuti target. Il periodo di prepatenza nel cane dura circa 28 giorni; il ciclo completo dura una media di 81 giorni e si completa con l'ingestione del sangue infetto da parte di una nuova zecca. E' stata dimostrata, per *H.canis* la trasmissione intrauterina transplacentare dalla madre ai cuccioli; inoltre sono state evidenziate come possibili vie di trasmissione la predazione e il carnivorismo su un altro ospite intermedio o di trasporto, mediante ingestione di cisti tissutali monoizoiche o dizoiche definite cistozoiti, presenti soprattutto a livello di milza e muscolatura scheletrica (Smith,1996; Baneth,2003; Baneth,2007; Ivanov, 2008; Taylor,2010 ; Baneth,2011).

150.000 leucociti/ μ l sangue) (Baneth,2006 ; Ivanov,2008 ; Marchetti,2009; Sakuma,2009; Baneth,2011).

Il meccanismo alla base di questa marcata leucocitosi, principalmente neutrofilica, non è stato ancora chiarito (www.veteriankey.com).

In alcune occasioni sono stati osservati anche iperestesia muscolare, congiuntivite purulenta e rinite; molto raramente sono stati riportati diarrea (spesso sanguinolenta), paraparesi e paraparalisi (Ivanov,2008).

L'associazione tra gravità dei segni clinici ed entità della parassitemia è stata dimostrata da diversi studi (Baneth,2011).

La parassitemia massiva riflette l'elevato numero di schizonti tissutali, i quali sottraggono nutrienti all'ospite e provocano un danno diretto ai tessuti coinvolti, determinando così il marcato dimagrimento, la cachessia e la profonda letargia (Baneth,2003).

Le alterazioni ematologiche più comunemente riscontrate in corso di epatozoonosi : (1) anemia principalmente normocitica normocronica e occasionalmente rigenerativa (Mundim,2008 ; Marchetti,2009; Baneth,2011; www.veteriankey.com) ; (2) leucocitosi molto marcata, ma solo in presenza di elevata parassitemia ; (3) possibile trombocitopenia, soprattutto in presenza di infezione concomitante con *E.canis* ; (4) ipoprotidemia con iperglobulinemia policlonale e ipoalbuminemia ; (5) incremento di CK e ALP (Gavazza,2003; Baneth,2011).

La parassitemia elevata può causare un danno diretto ai tessuti infetti e coinvolgere il sistema immunitario, con cachessia, nonostante il mantenimento dell'appetito. I cani con bassa parassitemia di solito non presentano lesioni, quelli fortemente parassitemici possono invece presentare epatite, polmonite e glomerulonefrite, associate alla presenza di numerosi schizonti, anche a livello di milza, midollo osseo e linfonodi (Taylor,2010; Baneth,2011).

Le lesioni a livello periostale sono principalmente legate all'infestazione da *H.americanum* , tuttavia sono state riscontrate reazione periostale e meningoencefalomielite in pochissimi soggetti anche nel Vecchio Continente tra cui un caso in Italia, ad indicare che anche *H. canis* può attaccare il tessuto osseo (Marchetti,2009 ; Lappin,2010 ; Baneth,2011).

La patogenesi dell'epatozoonosi è fortemente influenzata dallo stato immunitario del soggetto ospite : condizioni di immunosoppressione indotta da un altro agente infettivo concomitante, immaturità immunitaria nei soggetti giovani o immunodeficienza infatti indeboliscono la risposta immunitaria del soggetto, incrementando la sensibilità ad una nuova infezione o la possibile ri-acutizzazione di una infestazione silente pre-esistente (Baneth,2003 ; Ivanov,2008; Baneth,2011; www.veteriankey.com) .

E' importante ricordare che i segni clinici possono essere esacerbati dalla presenza di infezioni concomitanti con parvovirus, *E.canis*, *Babesia spp*, *Anaplasma spp*, *Toxoplasma gondii* e *L. infantum* (Gavazza,2003; Gal,2007 ; Tsachev,2008; Gotsch,2009; Sasanelli,2009; Tabar,2009; Cardoso,2010; Baneth,2011).

L'infezione da *H.canis* suscita una distinta risposta umorale nei primi stadi dell'infezione ; al momento non sono disponibili informazioni riguardo la risposta cellulo-mediata dell'organismo, tuttavia trattandosi di un parassita intracellulare, molto probabilmente ricopre il ruolo principale nel meccanismo di difesa dell'organismo ospite (www.veteriankey.com).

La diagnosi di solito si basa sull'identificazione microscopica dei gamonti nel citoplasma dei neutrofili, più raramente dei monociti, in strisci di sangue o buffy coat colorati con Giemsa o Wright; sono riconoscibili per la forma ellissoidale e le dimensioni (11 µm x 4 µm), in genere si trovano al centro del citoplasma cellulare e spingono il nucleo contro la membrana (Baneth,2003 ; Taylor,2010 ; Baneth,2011; www.veteriankey.com).

Gli schizonti possono essere osservati all'interno di preparati istologici o a impressione da linfonodi, milza e midollo osseo; appaiono come strutture rotondi o ovalari di circa 30µm di calibro, contengono al loro interno o 2-4 macromerozoiti o più di 20 micromerozoiti, disposti in modo da dare il caratteristico aspetto a "ruota a raggio" (Baneth,2006; Ivanov,2008; Baneth,2011).

E' stato messo a punto un test sierologico IFAT per la ricerca degli anticorpi anti- *H.canis*, ma in genere viene impiegato all'interno di studi epidemiologici. L'analisi PCR su sangue rappresenta uno strumento diagnostico molto importante e dotato di maggiore sensibilità rispetto alla lettura microscopica dello striscio di sangue. Nel caso in cui non sia disponibile l'analisi PCR, è consigliabile preferire l'esame citologico su buffy coat, piuttosto che su sangue intero. La PCR può essere impiegata (Baneth,2011; Otranto,2011)

E' stata messa a punto per *H.canis*, la tecnica di PCR real -time per quantificare la carica parassitaria (Criado-Fornelio, 2007 ; Li,2008; Baneth,2011).

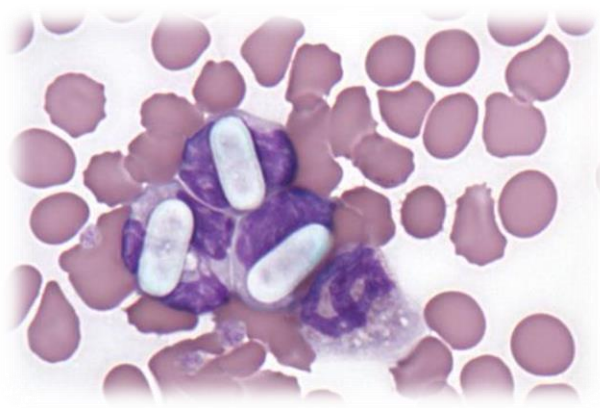


Figura 5.6 - gamonti nel citoplasma di neutrofili circolanti (www.studyblue.com)

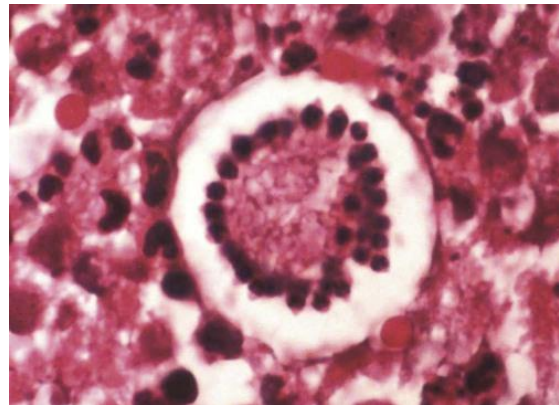


Figura 5.7 -Schizonte di *H.canis* contenente i micromerozoiti dall'aspetto tipico a "ruota a raggi" . *H. canis* meront containing micromerozoites forming a "wheel-spoke" shape in splenic tissue (H&E stain, ×400) (www.veteriankey.com)

Anche altre malattie fanno parte delle CVBDs ma non sono state incluse nella parte sperimentale della tesi :

Rickettsiosi o Rocky Mountain Spotted Fever o Febbre Maculosa delle Montagne Rocciose

La Rickettsiosi è una patologia trasmessa da zecche causata dal batterio *Rickettsia rickettsii*. Colpisce uomini e cani ed è associata ad emorragie cutanee o retiniche, epistassi, melena, ematuria ed altri reperti clinici. Tutti i cani infetti manifestano segni di malattia. In seguito al trattamento ed alla risoluzione dei sintomi il batterio viene eliminato (Reine,2004; Wardrop,2005,2016).

Dirofilariosi

La Dirofilariosi è patologia cardio-polmonare trasmessa da zanzare, causata dal nematode *Dirofilaria immitis*. La trasmissione di microfilarie (primo stadio larvale circolante nel sangue del cane infetto) via trasfusione è possibile, ma non è sufficiente a determinare la malattia nel ricevente poiché, per completare il ciclo biologico, è indispensabile che il parassita compia delle fasi nel vettore (Wardrop,2005,2016).

Borreliosi o Malattia di Lyme

Patologia zoonotica causata dalla spirocheta *Borrelia burgdorferi* e trasmessa dalle zecche del genere *Ixodes*. Le infezioni determinano segni clinici come zoppia per poliartrite, febbre, linfadenopatia e glomerulonefriti. La trasmissione via trasfusione non è accertata,

nonostante il sangue possa risultare positivo alle indagini molecolari (Wardrop,2005, 2016).

Bartonellosi

Nel cane la bartonellosi è sostenuta principalmente da *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffi*, un batterio a localizzazione intraeritrocitaria trasmesso da vettori e isolato in cani con endocarditi, miocarditi e malattie granulomatose. La trasmissione via trasfusione non è stata riportata ma è potenzialmente possibile. È un patogeno emergente (Reine,2004; Wardrop,2005,2016).

3.2 SCREENING DELLE CVBDs NEI CANI DONATORI

La trasfusione di sangue intero, così come di prodotti trasfusionali, rappresenta una pratica terapeutica salva-vita per numerose condizioni patologiche, tuttavia non è esente da rischi, anche gravi. Oltre alle reazioni di natura immuno-mediata, determinate dalla somministrazione di cellule allogeniche o proteine, e alle complicazioni non immuno-mediate (ad es. trombosi o intossicazione da citrato), al ricevente possono essere trasmesse anche malattie infettive qualora il sangue o i suoi prodotti siano contaminati con patogeni cosiddetti “blood –borne”. Questo aspetto è molto importante e non va mai sottovalutato, in quanto la maggior parte dei pazienti che necessitano la somministrazione di sangue e derivati sono in condizioni critiche, e spesso sotto terapia immunosoppressiva (ad es. in corso di IMHA o trombocitopenia immunomediata), pertanto sono particolarmente sensibili ad eventuali infezioni. Per cercare di minimizzare il più possibile il rischio di trasmissione è necessario improntare un adeguato screening di tutti i donatori, anche se in realtà stabilire il pannello di malattie da testare è difficile a causa della variabile incidenza geografica, l’esistenza di uno stato di portatore cronico per alcune patologie, difficoltà di selezionare adeguati screening test e soprattutto i costi (Reine, 2004 ; Crawford, 2013 ; Wardrop,2016).

I fattori da prendere in considerazione per decidere quali malattie devono essere oggetto di screening per i soggetti donatori sono: il riconoscimento scientifico della trasmissibilità mediante trasfusione, l’entità delle conseguenze sul ricevente infettato, la prevalenza nella regione geografica in cui vive o viaggia spesso il donatore (Reine, 2004).

Il fattore geografico è molto importante perché influenza la diffusione dei vettori e conseguentemente la diversa prevalenza delle varie malattie: ad esempio studi eseguiti su cani donatori nel Regno Unito hanno rilevato una prevalenza piuttosto bassa dei principali emopatogeni trasmissibili (*Babesia spp*, *L.infantum*, *E.canis*, *Anaplasma spp.*) per la mancanza dei vettori specifici sul territorio. In realtà al giorno d'oggi la questione è diventata molto più complessa a causa della globalizzazione e delle regolamentazioni che hanno facilitato gli spostamenti degli animali tra i vari Paesi, così come dei cambiamenti climatici che hanno alterato i vari microclimi e di conseguenza la diffusione dei vettori. Infatti altri studi hanno dimostrato la comparsa recente di qualche caso di infezione sia in soggetti viaggiatori che non viaggiatori, probabilmente entrati a contatto con ospiti reservoir o vettori (Crawford, 2013). Conoscere la circolazione delle CVBDs tra le popolazioni canine pertanto è essenziale per poter stimare il rischio di trasmissione delle stesse mediante trasfusione (Wardrop, 2016; Vascellari, 2016).

Numerose CVBDs possono essere trasmesse anche mediante trasfusione di sangue, pertanto viene garantita la sicurezza e l'esenzione del sangue donato da tali patologie mediante screening sierologici e molecolari dei cani donatori (Wardrop, 2016).

I patogeni per cui gli studi raccomandano l'esecuzione dei test di screening rientrano in tre categorie : patogeni per cui è documentata l'infezione clinica nei riceventi mediante trasfusione ; patogeni potenzialmente in grado di provocare infezione subclinica tale da essere rilevata inavvertitamente in donatori sani ; patogeni rilevabili mediante esame colturale o molecolare del sangue di un animale infetto e l'infezione risultante nel soggetti riceventi può potenzialmente metterne a rischio la vita ed essere difficilmente eliminabile mediante terapia con antimicrobici. In realtà sarebbe opportuno estendere l'esecuzione di un pannello standard di test anche per quei patogeni che per ora sono stati trasmessi mediante trasfusione solo sperimentalmente senza che sia stata registrata malattia clinica dopo la trasfusione (Wardrop, 2016). Esistono diversi tipi di test : test di screening ad alta sensibilità e bassa incidenza di falsi negativi, e test di conferma ad elevata specificità e ridotta incidenza di falsi positivi (Reine, 2004).

Gli studi suddividono due diversi standard di screening da applicare, ottimale e minimale in relazione alla letteratura medica esistente e all'esperienza clinica dei vari Autori. Lo standard ottimale è stato messo a punto per ridurre al massimo il rischio mediante l'applicazione dei test diagnostici attualmente disponibili ; tuttavia la sua applicazione potrebbe non essere necessaria per tutti i contesti geografici e per tutti i contesti da cui proviene il donatore (razza, ambiente..), inoltre molti test inseriti al suo interno hanno

limitata disponibilità anche in termini economici. Per questo motivo, tenendo conto di tutti questi fattori è stato sviluppato lo standard minimale, anche se per molti risulta essere insufficiente e rischia di far inserire animali infetti nel parco donatori. Alcuni autori hanno proposto un compromesso elaborando strategie alternative per particolari regioni geografiche in cui la prevalenza di infezione potrebbe essere alta e risulta difficile l'identificazione di donatori idonei, così come il completo screening dei potenziali donatori in condizioni di emergenza : in queste condizioni può essere accettato anche un donatore apparentemente sano ,considerato che da una parte abbiamo un ridotto rischio di infezione ma dall'altra elevato rischio di morte del ricevente per mancata trasfusione. In ogni caso il completo e preventivo screening dei donatori rimane la principale strategia per garantire la sicurezza dei prodotti trasfusionali, insieme ad una corretta manipolazione e conservazione dei prodotti trasfusionali (Wardrop, 2016).

In ambito umano ogni unità di sangue intero raccolta viene sottoposta a screening per gli agenti infettivi, in medicina veterinaria l'inferiore disponibilità di risorse economiche limita l'applicazione dei test diagnostici ai soli soggetti donatori; gli Autori raccomandano di effettuare tali analisi nella fase di selezione del donatore, dopo 3 mesi e poi minimo una volta all'anno per i soggetti volontari. Deve essere considerata una maggior frequenza per alcuni patogeni in aree endemiche e in donatori particolarmente esposti al rischio, ad esempio all'esposizione ai vettori delle malattie (Reine, 2004 ; Wardrop, 2016).

E' molto importante inoltre minimizzare la possibile esposizione alle infezioni mediante il controllo dell'ambiente in cui vivono i donatori (ad es. riducendo i viaggi o l'esposizione a nuovi animali) e con l'inizio di un programma di profilassi anti-ectoparassitaria (Reine, 2004).

La diagnosi delle CVBDs è piuttosto complessa, in quanto i segni clinici indotti dai vari patogeni sono spesso molto simili tra loro e la frequente presenza di co-infezioni con due o più patogeni può portare ad una loro sovrapposizione o anche alla comparsa di segni atipici : uno studio ha dimostrato , ad es., che in caso di co-infezione *E. canis* – *L. infantum* i segni clinici (linfadenomegalia, splenomegalia, epistassi, onicogrifosi, dermatite e perdita di peso) sono più frequenti ed evidenti in corso di co-infezione (88% soggetti) piuttosto che con l'infezione singola (44%), per effetto del sinergismo patologico tra agenti patogeni, in particolare questo studio dimostra come l'ehrlichiosi rappresenti un fattore contribuente all'insediamento di *Leishmania* (Mekuzas, 2009).

Lo screening dei donatori dovrebbe essere sempre accompagnato da una completa anamnesi, (soprattutto riguardante contatti con altri animali, viaggi e spostamenti per capire

se devono essere prese in considerazioni ulteriori patologie) e da un esame clinico accurato per verificare lo stato di salute del donatore ed evidenze eventuali segni clinici, anche non ben manifesti, di infezione (ad es. febbre, anemia o gonfiore delle articolazioni). (Reine, 2004 ; Wardrop, 2016). Tutto ciò deve essere supportato da risultati dei test citologici, sierologici e molecolari (Testini, 2010).

A partire dagli ultimi dieci anni è stata comprovata l'utilità delle tecniche molecolari, in particolare la PCR, nella conferma diagnostica di numerose CVBDs, mentre la sierologia e la citologia sono state da sempre impiegate in studi epidemiologici o per confermare una diagnosi clinica (Testini, 2010).

Ad ogni modo è sempre importante sottolineare che nessun test diagnostico per le malattie infettive ha una sensibilità e specificità del 100%, per cui è necessario scegliere il test migliore in relazione al patogeno e al contesto in cui ci si trova : ad es. in situazioni a bassa prevalenza di infezione (nel caso di alcuni patogeni in animali sani rispetto di animali malati) i risultati positivi rappresentano più probabilmente dei falsi positivi rispetto a regioni ad alta prevalenza e per questo andrebbero verificati con un secondo test, meglio se presso un laboratorio di riferimento. I principali test impiegati per lo screening delle CVBDs possono dunque essere di natura molecolare o sierologica. La PCR o Polymerase Chain Reaction, è un test che permette l'amplificazione di specifici acidi nucleici microbici, pertanto indica la presenza di patogeni ad alta garanzia di affidabilità. Questa tecnica presenta elevata sensibilità – specificità, può testare rapidamente e contemporaneamente più di un patogeno e rilevarne la presenza anche in assenza di malattia clinicamente evidente . Per quanto riguarda gli svantaggi legati alle tecniche molecolari come la PCR si ritrovano: mancanza di test “point –of-care” su base molecolare; mancanza di standardizzazione del protocollo di analisi tra i vari laboratori con conseguenti variazioni di sensibilità – specificità; infine il costo elevato di ogni singola analisi. E' importante sottolineare, inoltre, che una elevata sensibilità analitica della PCR non implica necessariamente elevata sensibilità clinica: il test infatti può rilevare piccole quantità di DNA in laboratorio ma ha scarsa sensibilità nel rilevare gli agenti patogeni in un campione di sangue di dimensioni ridotte ,non può amplificare ciò che non è presente nel campione raccolto. Per questo motivo spesso possono uscire fuori risultati falsi negativi nel caso in cui il patogeno sia presente in quantità ridotte in circolo, ad esempio *E. canis*. Le tecniche molecolari possono dare anche risultati falsi positivi, ad esempio in caso di amplificazione di DNA non target nel campione iniziale o contaminazione del campione (ad es. durante l'estrazione del DNA o l'esecuzione della PCR). Oltre a ciò la PCR rileva esclusivamente la presenza di DNA di un patogeno nel

campione di partenza ma non può distinguere se si tratta di un organismo vitale e attivo o morto, pertanto può determinare dei risultati falsi positivi in soggetti non più clinicamente infetti. I soggetti PCR- positivi per patogeni emo-trasmissibili clinicamente rilevanti dovrebbero essere esclusi dal pool dei donatori perché la positività indica la presenza di infezione; in caso di patogeni responsabili di infezioni croniche e persistenti è possibile eliminarli senza piena certezza mediante terapia antimicrobica, tuttavia è sempre consigliabile escludere animali con anamnesi di positività ai test di screening per questi patogeni.

I test sierologici sono test di diagnosi indiretta in quanto, mettendo a contatto il siero del soggetto in esame con antigeni specifici, ricercano e individuano specifici anticorpi circolanti. I test sierologici maggiormente impiegati, IFAT ed ELISA quantitativa, offrono una quantificazione della positività, definita titolazione anticorpale. La positività al test sierologico indica precedente esposizione all'agente infettivo ma non prova la presenza di infezione in questo preciso momento; un risultato negativo invece in genere indica assenza di infezione. Bisogna sottolineare, tuttavia, che il soggetto può risultare sieronegativo nel caso in cui il test venga eseguito durante la fase acuta di infezione da numerosi patogeni come *Ehrlichia* o *Anaplasma* perché gli anticorpi non sono ancora rilevabili, oppure in corso di infezione da altri patogeni, come *Bartonella*, che si comportano come organismi invisibili e riescono a eludere il sistema immunitario dell'ospite, non stimolando alcuna risposta anticorpale rilevabile. E' importante ricordare che anche in soggetti immunodepressi può fallire la risposta anticorpale specifica (in questo caso si tratta di soggetti clinicamente malati e quindi automaticamente esclusi dalla donazione). Un altro importante svantaggio è rappresentato dall'assenza di standardizzazione dei protocolli tra i vari laboratori e questo è molto importante, in quanto ogni differenza tra antigeni, preparati di antigeni, reagenti e protocolli può influenzare il risultato del test. Per questi motivi per alcuni patogeni particolarmente importanti viene richiesta una combinazione di tecniche sia sierologiche che dirette (quali PCR, esame colturale citologico) per aumentare l'efficacia della diagnosi (Crawford, 2013 ; Wardrop, 2016).

Diversi studi hanno dimostrato che la positività sierologica nei confronti dei patogeni trasmessi da zecche, anche a titolo molto elevati, deve essere valutata accuratamente e confermate mediante la valutazione dei segni clinici, la ri-esecuzione del test sierologico e l'esecuzione di test PCR, soprattutto nelle aree endemiche ; in queste condizioni vengono accettati solamente donatori sieropositivi ma PCR-negativi e in assenza di segni clinici.

Nel dettaglio le metodiche di screening più indicate per i singoli patogeni:

(1) *Anaplasma phagocytophilum* = il test base più comune per rilevare la presenza di *A. phagocytophilum* nei soggetti infetti è l'IFA e, da un punto di vista clinico, titolazioni > 1:80 indicano sieropositività; tuttavia questo test dà frequentemente falsi positivi. Inoltre è stato dimostrato che *A. phagocytophilum* può persistere nei tessuti e provocare infezione cronica sia nell'uomo che nel cane, per questo motivo lo standard ottimale prevede che i donatori siano testati mediante sierologia e PCR e siano esclusi i soggetti positivi a uno o entrambi i test. (Reine, 2004 ; Wardrop, 2016).

La presenza di elevati titoli anticorpali per *A. phagocytophilum* in assenza di evidenti segni clinici indica principalmente infezione precedente o infezione subclinica / lieve in cani non sottoposti ad accurate analisi di laboratorio per valutare il loro stato clinico (Vascellari, 2016).

Diversi studi hanno comunque evidenziato che, impiegando l'IFA come test di screening, in termini di sieroprevalenza non c'è una differenza significativa tra cani malati e sani (Kohn, 2011 ; Vascellari, 2016)

(2) *Babesia spp.* = La diagnosi di babesiosi clinica avviene mediante lettura dello striscio ematico mediante microscopia diretta, IFAT e PCR. L'esame dello striscio non può essere impiegato come test di screening in quanto si basa sulla presenza di parassitemia e molti soggetti apparentemente sani sono portatori di *Babesia* anche senza rilevante parassitemia. L'IFAT è un test immediato e molto semplice da eseguire, la PCR invece richiede una tempistica maggiore ma ha una maggiore specificità e dovrebbe essere sempre eseguita su soggetti ad alto rischio in cui la sierologia è negativa. Lo screening ottimale include sierologia e PCR ad ampio raggio (per tutte le specie di *Babesia* conosciute nel cane), invece lo screening minimale prevede solamente PCR ad ampio raggio: ogni soggetto positivo ad uno /entrambi i test deve essere escluso dal pool donatori. In presenza di levrieri o cani in cui è nota l'esposizione alle zecche è consigliabile eseguire uno screening ulteriore mediante PCR per incrementare la sensibilità. Lo screening per babesia è essenziale : sono riportati in letteratura casi di babesiosi fulminante con shock ipotensivo acuto in soggetti trasfusi con sangue di donatori non testati (Reine, 2004 ; Wardrop, 2016)

(3) *Ehrlichia canis* = *E. canis* è sicuramente il più importante agente patogeno da controllare nello screening dei donatori per l'elevata prevalenza praticamente in tutto il mondo e la propensione a provocare infezione cronica e persistente. Lo screening dei potenziali donatori prevede l'esecuzione di test IFA per la ricerca degli anticorpi diretti contro *E. canis*, (da un punto di vista clinico le titolazioni > 1:80 indicano sospettata presenza di ehrlichiosi) e PCR, soprattutto nei soggetti IFAT negativi. (Reine, 2004 ; Wardrop, 2016).

(4) *Hepatozoon canis* = Non è stata dimostrata scientificamente la trasmissione mediante trasfusione ematica; si consiglia lo screening nelle aree endemiche mediante specifici test PCR (Wardrop, 2016).

(5) *Leishmania infantum* = La sierologia IFA per *Leishmania* ha una ridotta sensibilità nei soggetti infetti in modo subclinico o cani che vivono in aree endemiche , pertanto i potenziali donatori dovrebbero essere testati anche con la PCR . Il test IFA per *Leishmania* può dare cross-reazione con *Trypanosoma cruzi*: sebbene i cani risultati positivi andrebbero esclusi dalla donazione, i soggetti sieropositivi per *Leishmania* andrebbero ri-testati per cercare la presenza di specifici anticorpi contro *T.cruzi* (Reine, 2004 ; Wardrop, 2016).

C'è grande dibattito su quale sia il migliore test di screening per la diagnosi di *L. infantum* : nei soggetti clinicamente affetti la PCR su campione di sangue ha una minore sensibilità rispetto a PCR eseguita su midollo osseo, linfonodo, cute o congiuntiva ma il prelievo di tali campioni in soggetti sani non ha giustificazione etica. La reattività immunitaria e sierologica si ha dopo alcuni mesi dall'infezione e può non essere affidabile nel rilevare i soggetti infetti. L'approccio ideale per lo screening della *Leishmania* nei potenziali donatori è rappresentato dalla combinazione PCR e sierologia (Crawford, 2013).

La scelta dello standard di screening da eseguire dovrebbe essere fatta in relazione a numerosi fattori quali : localizzazione geografica, razza del soggetto e documentazione di attuale trasmissione mediante trasfusione (Reine, 2004 ; Wardrop, 2016).

PARTE SPERIMENTALE

1. PREMESSA

La trasfusione di sangue intero, così come di altri prodotti trasfusionali, rappresenta una pratica terapeutica salva-vita per numerose condizioni patologiche; tuttavia non è esente da rischi, anche gravi. Numerose patologie “blood-borne” trasmesse normalmente da vettori possono infatti passare dal donatore al soggetto ricevente anche mediante la trasfusione di sangue. Questo aspetto è molto importante e non va mai sottovalutato, in quanto la maggior parte dei pazienti che necessita la somministrazione di sangue e derivati è in condizioni critiche, e spesso sotto terapia immunosoppressiva (ad es. in corso di IMHA o trombocitopenia immunomediata), pertanto si tratta di soggetti particolarmente sensibili ad eventuali infezioni. Per cercare di minimizzare il più possibile il rischio di trasmissione e garantire sicurezza ed esenzione del sangue donato da tali patologie, i principali gruppi di studio della medicina trasfusionale e la Linea Guida Ministeriale italiana in materia di trasfusioni nel campo veterinario, stabiliscono la necessità di un adeguato screening sierologico e molecolare di tutti i donatori (Reine, 2004; Crawford, 2013; Wardrop, 2016; Ministero della Salute, 2016).

La parte sperimentale di suddetta tesi ha lo scopo di approfondire le modalità di screening dei soggetti donatori più comunemente impiegate all'interno delle banche del sangue, per verificarne la validità, mediante confronto tra le tecniche impiegate. Il lavoro consiste nello screening di un gruppo di donatori canini del Centro Trasfusionale Veterinario dell'Università di Pisa, clinicamente sani e in assenza di alterazioni emato-biochimiche, mediante il confronto tra sierologia (IFAT) e analisi biomolecolare, PCR end point e rtq-PC, per i principali emo-patogeni trasmissibili in Centro Italia: *Babesia spp.*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum* e *Hepatozoon spp.* Tale screening è finalizzato a verificare, mediante analisi biomolecolare con PCR end-point e rtq, la presenza del DNA di tali agenti patogeni nei campioni ad elevata titolazione anticorpale, confermare i soggetti negativi e saggiare le titolazioni dubbie o “borderline” al fine di includere / escludere dalla donazione potenziali donatori.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Selezione dei campioni

Per la realizzazione dello studio sono stati selezionati 42 campioni di sangue intero in EDTA congelato, prelevati in contemporanea alla donazione per eseguire le analisi di controllo (conformemente alle indicazioni espresse in merito dalla Linea Guida) nel periodo di tempo intercorrente tra gennaio 2014 e febbraio - marzo 2016. I campioni selezionati provengono da 29 soggetti donatori canini volontari del CTV del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa (per rispettare l'impostazione basilare del lavoro sono stati impiegati anche più campioni consecutivi nel tempo dello stesso soggetto) appartenenti a sesso e razza diverse tra loro (vedi tabella 1). L'età varia tra i 3 e 8 anni.

Razza	Numero	Maschi	Femmine
Boxer	12	4	8
Meticcio	10	2	8
Golden retriever	2	2	-
Labrador	1	1	-
Border collie	1	-	1
Terranova	1	-	1
Weimaraner	1	-	1
Dobermann	1	-	1

Tabella 1. Dati segnaletici dei cani donatori

Nel CTV, conformemente ai precetti della Linea Guida Ministeriale, i campioni sono sottoposti a screening sierologico per *L. infantum*, *E. canis* e *A. phagocytophilum*, mediante tecnica IFAT. I risultati delle analisi vengono inseriti nella cartella clinica elettronica del soggetto. I campioni oggetto dello studio sono stati selezionati sulla base dei risultati al test sierologico per ogni agente patogeno e suddivisi nei seguenti gruppi allo scopo di effettuare un confronto tra i risultati ottenuti:

- *Ehrlichia canis*: 15 campioni totali
 - 5 campioni con titolo > 1:80 (sierologicamente positivi)
 - 5 campioni con titolo 1:40 (dubbi)
 - 5 campioni negativi
- *Anaplasma phagocytophilum* : 12 campioni totali
 - 4 campioni con titolo > 1: 80 (sierologicamente positivi)

- 3 campioni con titolo 1:40 (dubbi)
- 5 campioni negativi
- *Leishmania infantum* : 15 campioni totali
 - 5 campioni con titolo > 1 :160 (sierologicamente positivi)
 - 5 campioni con titolo 1 :40 – 1: 80 (dubbi)
 - 5 campioni negativi

Presso il CTV di Pisa, in caso di sieropositività a basso titolo, i soggetti non sono esclusi immediatamente dal gruppo donatori, in funzione del fatto che si tratta di animali clinicamente sani e senza alterazioni clinico-patologiche riconducibili alla malattia. Tutti i campioni prelevati contestualmente alle donazioni, inclusi quelli oggetto dello studio, vengono normalmente sottoposti anche a screening per *Babesia Spp.* mediante ricerca microscopica dei merozoiti nello striscio di sangue, tuttavia non sono state rilevate positività. In questo studio i 42 campioni presi in esame sono stati sottoposti ad analisi di biologia molecolare mediante PCR qualitativa end – point presso i laboratori di Parassitologia e Malattie Infettive del Dipartimento di Scienze Veterinarie, oltre che per i patogeni abitualmente controllati mediante sierologia, anche per *Babesia spp.* e *Hepatozoon canis*, per cui solitamente non è previsto alcun screening sierologico. I campioni risultati positivi alla PCR end - point, 11 su 42, sono stati successivamente inviati al “Laboratorio Veterinario Privato San Marco”, a Padova, per effettuare analisi rtq-PCR o PCR quantitativa, e definire così l’effettiva valenza della positività riscontrata. Alcuni campioni sono stati inviati anche alla sede di Padova dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per un ulteriore controllo della ricerca di *L. infantum*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* (Solano-Gallego et.al, 2007; Trotta et.al, 2012)

2.2 Sierologia – IFAT

Per *L. infantum* i campioni sono stati sottoposti a test di immunofluorescenza indiretta o IFAT allestito mediante: Phosphate Buffered Saline pH 7,3 ± 1, vetrino per immunofluorescenza indiretta adsorbito con l’antigene del patogeno, coniugato FITC per immunofluorescenza indiretta anti-canine IgG, glicerina e siero di sangue IFAT negativo per il patogeno considerato. Il siero in esame viene diluito per raddoppio in base dieci e posto a contatto con l’antigene a 37 ° in camera umida per 30 minuti, dopo il lavaggio si aggiunge un’anti-globulina specifica coniugata con istiocianato di fluorescina; dopo ulteriore incubazione a

37° gradi in camera umida per altri 30 minuti i vetrini vengono lavati e montati con glicerina per essere guardati con microscopio a fluorescenza (Mancianti,1988)

Per *A. phagocytophilum* ed *E. canis* sono stati impiegati specifici vetrini a pozzetto preparati con cellule infette rispettivamente da *A. phagocytophilum* ed *E. canis* (Fuller Laboratories Fullerton, USA). Il campione di sangue viene diluito 1: 40 con PBS 7.2 e incubato nei pozzetti del vetrino in una camera umida a 37° gradi per 30 minuti. I vetrini vengono immersi tre volte in PBST (PBS + 0,4% Tween 80 – Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA) e una volta in acqua distillata, dopodiché lasciati ad asciugare all'aria. In ogni pozzetto vengono posti gli anticorpi, i FITC specifici per la specie animale testata, i vetrini sono messi nuovamente ad incubare analogamente a prima e poi osservati con microscopio a fluorescenza (Ebani, et al., 2014).

I titoli anticorpali considerati positivi sono superiori o pari a 1:80 per *E. canis* e *A. phagocytophilum*, superiori o pari a 1:160 per *L. infantum*.

2.3 PCR end -point

Il DNA è stato estratto dai campioni di sangue congelato mediante il kit di estrazione Blood /Cultured Cell Genomic DNA Extraction Mini Kit ® (Fisher Molecular Biology, Trevose, PA, USA). Per l'estrazione 200µl di sangue intero in EDTA sono addizionati a 200 µl di Proteinasi K e 200 µl di buffer FSBG, seguono poi diverse fasi consequenziali: lisi cellulare per l'esteriorizzazione del DNA, legame del DNA esteriorizzato, lavaggio, eluizione del DNA e raccolta in apposite provette eppendorf. L'attività di estrazione è stata realizzata conformemente al protocollo che viene fornito insieme al kit di estrazione. A seguito dell'estrazione il DNA viene sottoposto a PCR, dopo esser stato inserito in una particolare soluzione che permette la reazione e comprende sia i primers che un buffer per PCR già pronto. La soluzione viene inserita all'interno del termociclatore in cui avvengono i cicli di amplificazione dei filamenti estratti, fino ad esaurimento dei reagenti. Il termociclatore disponibile presso il Laboratorio di Parassitologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie è il Biorad S1000. I primers impiegati sono: HepF e HepR (Inokuma,2002) per *Hepatozoon*; L5.8S e LITSR per *Leishmania* (Tai,2000); MIC 1 e MIC 2 per *Babesia* (in realtà per i Piroplasmidi in generale) (Beck,2008). Sono stati aggiunti alla reazione controlli positivi e negativi.

Per la ricerca di *E. canis* e *A. phagocytophilum* il laboratorio di Malattie Infettive del Dipartimento di Scienze Veterinarie effettua, oltre al protocollo di PCR end-point, una nested-

PCR a 60 cicli di amplificazione, per aumentare ulteriormente la sensibilità del test e impedire l'amplificazione di sequenze non specifiche. Le amplificazioni vengono realizzate grazie all'utilizzo dell'EconoTq PLUS 2x Master Mix (Lucigen Corporation, Middleton, Wisconsin, USA) e un termociclatore automatico (Gene- Amp PCR System 2700, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut).

Nel caso di *A. phagocytophilum* viene effettuata una prima amplificazione un frammento 932 bp del gene 16S rRNA, impiegando i primers GE 3a e GE 10r. Si va ad eseguire una nested- PCR per amplificare un frammento 546 bp dello stesso gene, mediante i primers GE 9f e GE 2 (Massung et al., 1998).

Nel caso di *E. canis* viene effettuata una iniziale amplificazione di un frammento 478 bp comune a tutte le specie conosciute di *Ehrlichia*, mediante i primers ECB e ECC (Dawson et al, 1994). Nella nested -PCR conseguente viene amplificato un frammento 389 bp del gene 16S rRNA di *E.canis* con i primers HE3 e ECA (Wen et al, 1997).

I prodotti PCR sono analizzati mediante elettroforesi su gel all'1,5% di agarosio a 100V per 45 minuti, il gel viene successivamente colorato con etidio di bromuro e osservato mediante transilluminatore a raggi UV.

2.4 PCR real -time

La qPCRs realizzata per la quantificazione di *L.infantum* è stata effettuata utilizzando il LightCycler® versione 3.517 (Roche Applied Science), primers commerciali per *L. infantum*, ITS76 e ITS528 (Primer3Plus) e sonde di ibridazione LC Set (TIB MOLbiol). Sono stati aggiunti alla reazione controlli positivi e negativi. Il protocollo è stato eseguito seguendo le istruzioni del fornitore del kit (TIB Molbiol), le temperature da raggiungere all'interno dei cicli sono state impostate automaticamente da un software, Applied Biosystem 3730XI DNA Analyzer.

La real time PCR per *A. phagocytophilum*, *Babesia spp*, *E.canis* ed *H.canis* è stata effettuata utilizzando sempre lo strumento LightCycler 1.31® (Roche) e primers commerciali. La reazione viene considerata positiva in presenza di un incremento esponenziale nella fluorescenza (Solano -Gallego, et al., 2007; Trotta, et a., 2012).

3. RISULTATI

I risultati ottenuti sono molto interessanti e anche inattesi. Su 42 campioni testati sierologicamente, 11 campioni in totale sono risultati positivi alla PCR end-point: 2 campioni positivi per *L.infantum* (0,3%), 2 campioni positivi per *H.canis* (0,84%), 7 campioni positivi per *E.canis* (1,05%), e 2 dei quali sono risultati positivi anche per *A. phagocytophilum* (0,26%). Nessuna positività è stata riscontrata invece per *Babesia spp.* Gli esiti della PCR end-point mostrano solo in alcuni casi concordanza con la sierologia (vedi tabella 2).

Per *L. infantum* solamente 2 campioni hanno confermato con la PCR la titolazione sierologica positiva (una delle quali anche elevata, pari a 1:320), mentre i restanti campioni, sia negativi che dubbi, sono risultati negativi.

Per *E. canis* la PCR ha confermato la positività sierologica in 2 campioni, mentre i 3 sierologicamente positivi rimanenti sono risultati negativi; 2 campione sierologicamente negativi sono risultati PCR positivi, mentre i 3 restanti sono rimasti negativi; 3 campioni sierologicamente borderline (1:40) sono risultati PCR positivi, gli altri 2 invece PCR negativi.

Per *A. phagocytophilum* sono state confermate solo 2 positività sierologiche, le restanti invece sono risultate PCR negative; i soggetti sierologicamente negativi sono stati confermati e le titolazioni dubbie sono risultate negative.

E' importante sottolineare il riscontro di positività molecolare in campioni sierologicamente negativi, e di doppia positività molecolare per *E.canis* e *A.phagocytpphilum* contemporaneamente in due campioni di due soggetti diversi (risultati entrambi sierologicamente positivi solamente ad *Anaplasma*).

Non sono state ricavate positività per *Babesia spp.*, mentre sono stati individuati 2 campioni PCR positivi per *H. canis*.

La rtq-PCR ha confermato, di questi 11 campioni PCR positivi, solamente una positività (quantitativamente debole) per *H. canis*.

L'analisi molecolare di controllo eseguita presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, per la ricerca di *L. infantum*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* ha confermato le negatività risultate dalla rtq-PCR.

	<i>H. canis</i>		<i>Babesia spp.</i>		<i>L. infantum</i>			<i>E. canis</i>			<i>A. phagocytophilum</i>		
	PCR e.p.	Rtq-PCR	stri-scio	PCR e.p.	IFI	PCR e.p.	rtq-PCR	IFI	PCR e.p.	rtq-PCR	IFI	PCR e.p.	Rtq-PCR
1	Neg	Neg	Neg	Neg	1:320	Neg	-	-	-	-	-	-	-
2	Neg	Neg	Neg	Neg	1:320	Neg	-	-	-	-	-	-	-
3	Neg	Neg	Neg	Neg	1:160	+	Neg.	-	-	-	-	-	-
4	Neg	Neg	Neg	Neg	1:160	Neg	-	> 1:80	Neg	-	Neg	Neg	-
5	Neg	Neg	Neg	Neg	1:160	+	Neg.	-	-	-	-	-	-
6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-
7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-
8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-
9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-
10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-
11	Neg	Neg	Neg	Neg	1:80	Neg	-	-	-	-	-	-	-
12	Neg	Neg	Neg	Neg	1:40	Neg	-	-	-	-	-	-	-
13	Neg	Neg	Neg	Neg	1:80	Neg	-	-	-	-	-	-	-
14	Neg	Neg	Neg	Neg	1:40	Neg	-	Neg	Neg	-	Neg	Neg	-
15	Neg	Neg	Neg	Neg	1:40	Neg	-	-	-	-	-	-	-
16	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	> 1:80	Neg	-	Neg	Neg	-
17	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	>1:80	Neg	-	Neg	Neg	-
18	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	> 1:80	+	Neg.	Neg	Neg	-
19	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	> 1:80	+	Neg.	Neg.	Neg.	-
20	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	-
21	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	-
22	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.	-
23	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg	-
24	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	1:40	Neg.	-	Neg.	Neg.	-
25	Neg.	Neg	Neg	Neg	-	-	-	1:40	+	Neg	Neg.	Neg.	-
26	+	Pos.	Neg	Neg	-	-	-	1:40	Neg.	-	1:160	Neg.	-
27	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	1:40	+	Neg	1:40	Neg.	-
28	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	1:80	Neg.	-	Neg.	Neg.	-
29	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	+	Neg	>1:80	+	Neg
30	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	+	Neg	>1:80	+	Neg
31	+	Neg.	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	>1:80	Neg.	-
32	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	-
33	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	-
34	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	Neg.	Neg.	-
35	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	Neg.	Neg.	-	Neg	Neg.	-
36	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	1:40	Neg.	-	1:40	Neg.	-
37	Neg	Neg	Nege	Neg	-	-	-	1:40	Neg	-	1:40	Neg.	-

Tabella 2. Comparazione dei risultati delle analisi IFAT, PCR end – point e rtq-PCR

Legenda : IFI = immunofluorescenza indiretta ; PCR e.p = PCR end point ; rtq-PCR = PCR real time

4. DISCUSSIONE

Le discrepanze tra i risultati della PCR end - point e l'IFAT possono trovare giustificazione in diversi elementi. La positività molecolare in campioni sierologicamente negativi dipende dalla maggior sensibilità dell'analisi PCR rispetto all'IFAT dovuta al rilevamento diretto del DNA dell'agente patogeno nel campione, soprattutto se il prelievo è stato eseguito nei primi stadi dell'infezione, quando ancora non è iniziata la produzione anticorpale e quindi non può essere rilevata alcuna titolazione. La presenza di titolazioni anticorpali positive in campioni PCR negativi può essere giustificata da: (1) possibilità di cross-reazione anticorpale, soprattutto tra patogeni filogeneticamente correlati come *A.phagocytophilum* ed *E.canis*. (2) possibilità di un contatto del soggetto con il patogeno, indipendentemente dal manifestarsi della malattia clinica. Infatti, la sieropositività indica semplicemente che è avvenuto il contatto, non necessariamente contigente ma anche pregresso, con il patogeno, a cui può conseguire una risposta immunitaria specifica persistente e rilevabile per mesi (se non addirittura anni), o l'inizio di uno stato di malattia. La positività sierologica non è quindi indice della presenza di malattia in atto, soprattutto se a basso titolo. Di conseguenza il test IFAT in genere viene ripetuto a distanza di 4 settimane dal primo prelievo, per valutare la sieroconversione (tenendo conto che in condizioni di cronicità per determinati patogeni quali *E.canis* o *A. phagocytophilum* la titolazione anticorpale non subisce significative variazioni nel corso del tempo). (3) prelievo del campione successivamente alla clearance del patogeno da parte dell'organismo, per cui il suo DNA non è più rinvenibile ma persistono in circolo gli anticorpi specifici. E'infatti importante ricordare che la produzione di anticorpi insorge dopo una media di 8 giorni dall'esposizione al patogeno, ma persiste per mesi e in alcuni casi anni, ed è quindi rilevabile dai test sierologici anche dopo molto tempo. Alla luce di tutto ciò la letteratura è concorde nell'affermare che il risultato della sierologia deve essere interpretato sempre in relazione alla presenza di segni clinici, di alterazioni dell'assetto emato-biochimico e dell'elettroforesi delle sieroproteine, e all'esito dell'analisi PCR di conferma eseguita sempre su sangue prelevato al momento della donazione. In assenza di segni clinici, alterazioni di laboratorio e con risultato negativo della PCR il sog-

getto viene ritenuto ancora idoneo alla donazione, soprattutto nel caso di positività sierologica a basso titolo. A tal proposito la Linea Guida Ministeriale stabilisce la necessità di conservare, per ogni unità donata, un'aliquota di sangue intero in EDTA e siero congelati al fine di poter ri-eseguire le analisi di laboratorio e/o approfondire la ricerca di agenti patogeni infettivi mediante analisi PCR.

Tuttavia, è importante sottolineare che anche l'analisi PCR può fornire risultati falsi negativi, soprattutto in presenza di una carica patogena inferiore al valore di soglia della sensibilità di estrazione e amplificazione. La presenza di titolazioni anticorpali basse o borderline, smentite dalla PCR ad eccezione di 3 casi risultati positivi, lascia adito all'ipotesi di un contatto pregresso con l'agente patogeno senza insorgenza della malattia clinica, fenomeno di frequente riscontro nelle zone endemiche; a tal proposito bisogna ricordare che il Centro Italia è fortemente endemico sia per *Leishmania infantum* che per *E.canis*.

Per *L. infantum* è importante sottolineare, come ulteriore elemento, la scarsa sensibilità del materiale biologico di partenza: il sangue intero congelato è tra i tessuti meno sensibili per la ricerca del DNA del protozoo, rispetto ad altri come l'aspirato linfonodale o il tampone congiuntivale (Belinchòn-Lorenzo,2012).

Le discrepanze tra i risultati della PCR end-point e la rtq-PCR possono essere frutto di diversi fattori : (1) possibile contaminazione del campione; ipotesi meno probabile in quanto nei laboratori in cui è stata realizzata la PCR end-point sono stati inseriti in tutte le reazioni sia i controlli positivi che i controlli negativi, e questi controlli sono risultati alla lettura delle bande; inoltre il protocollo del laboratorio prevede misure di accortezza per prevenire la contaminazione del campione, tra cui la suddivisione del processo in due stanze separate, di cui una DNA -Free per il prelievo del DNA estratto. (2) Deterioramento del campione, sangue congelato, durante i trasporti e gli spostamenti dal Dipartimento di Scienze Veterinarie a Padova; l'ipotesi è plausibile ma lo sarebbe maggiormente in caso di deterioramento soltanto di alcuni campioni. (3) Ridotta carica patogena nel campione di partenza, per cui il DNA presente è stato estratto interamente nel corso della prima estrazione per la PCR end-point e ne è rimasta una quantità al di sotto della soglia di sensibilità del protocollo rtq-PCR. (4) Sensibilità inferiore della PCR end-point rispetto alla rtq- PCR anche se, proprio in virtù della maggiore sensibilità, la rtq-PCR avrebbe dovuto rilevare ulteriori elementi nei campioni in esame. A ciò bisogna aggiungere che per la ricerca di *E. canis* ed *A. phagocytophilum* il Laboratorio di Malattie Infettive del Dipartimento di Scienze Veterinarie applica un protocollo di nested-PCR a 60 cicli di amplificazione

che, andando ad amplificare ulteriormente frammenti ancora più specifici, permette un notevole aumento della sensibilità del test mediante scrematura delle sequenze scarsamente specifiche. (5) Discrepanze tra i protocolli impiegati in termini di quantità di campione necessario, reagenti e primers impiegati, ma soprattutto di sensibilità dei primers: più il primer è specifico per un determinato frammento specifico per un agente patogeno e maggiore è la sensibilità del test. La positività di 2 campioni a *L. infantum* riscontrate mediante PCR end-point (piuttosto deboli come suggerito dalla scarsa intensità delle bande ottenute) possono essere giustificate con il contatto tra parassita e ospite, reperto molto frequente nelle zone ad alta endemicità come l'Italia, anche in relazione al periodo del prelievo di questi campioni che è coerente con l'inizio di attività dei flebotomi (marzo e maggio). Può essere utile sottolineare che entrambi i soggetti risultati positivi a *L. infantum* avevano eseguito la vaccinazione mediante CaniLeish® precedentemente al periodo del prelievo del campione in questione; si potrebbe dunque attribuire ipoteticamente la debole positività della PCR end-point alla presenza del materiale biologico del vaccino in circolo, non amplificato successivamente dalla rtq-PCR maggiormente sensibile. Tuttavia le quantità somministrate non sono tali da determinare l'ingresso in circolo del materiale biologico.

La positività a *H. canis*, confermata anche dalla rtq-PCR, è giustificata in quanto *H. canis* è un patogeno comunemente diffuso nel Centro Italia e in Toscana, e può derivare dall'ingestione di una zecca infetta da parte del soggetto donatore in un qualsiasi spazio aperto, magari limitrofo ad aree boschive (il parassita è di frequente riscontro negli animali selvatici come le volpi). Questo risultato non desta particolare preoccupazione in quanto non è ancora stata dimostrata scientificamente la sua trasmissione mediante sangue infetto, inoltre (a differenza di *H. americanum* diffuso nel continente americano) *H. canis* non è particolarmente virulento e la maggior parte dei soggetti riscontrati infetti si mantiene clinicamente sana.

La negatività per *Babesia spp.* conferma lo screening diretto mediante lettura dello striscio ematico ed è concorde con la scarsa diffusione del parassita nel territorio italiano. *Babesia spp.*, infatti non è particolarmente diffusa nel territorio italiano in funzione della distribuzione ecologica del suo vettore competente (la zecca *Dermacentor reticulatus*); pertanto, in questo contesto, si ritiene sufficiente il controllo microscopico dello striscio di sangue.

5. CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti si ritiene, conformemente a quanto già specificato nella Linea Guida Ministeriale riguardo ai criteri di esclusione dei cani donatori, che il riscontro di titolazioni sierologiche positive a basso titolo, in assenza di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche correlate alla patologia e con risultato negativo all'analisi molecolare non deve essere considerata come motivo di esclusione del donatore. Tutte le patologie non vanno mai valutate mediante i risultati delle singole analisi, ma sempre in modo complessivo nell'ambito del quadro clinico del soggetto, perché i fattori che possono influenzare l'esito dei risultati sono molteplici. Per incrementare l'efficacia dei protocolli di screening dei soggetti donatori si ritiene maggiormente opportuno eseguire direttamente la rtq-PCR rispetto alla end-point in virtù della maggiore sensibilità e della possibilità di quantificare la carica patogena. Può essere auspicabile inoltre aggiungere, al protocollo di screening dei cani donatori, il prelievo di un tampone congiuntivale per incrementare la sensibilità della ricerca di *L. infantum* in modo non invasivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrams - Ogg, A.C.G., Schneider, A. (2012). **Principles of canine and feline blood collection, processing and storage**. Ln : *Schalm's veterinary hematology*, 6th edition. Wiley Blackwell, Iowa (USA) , 2012 , pp 731 -737.
2. Abrams-Ogg A. (2004). **Pratica emotrasfusionale**. In UTET (Ed.), *Ematologia e medicina trasfusionale del cane e del gatto* (pp. 271-316).
3. Acierno, M.M., Raj, K., Giger, U. (2014). **DEA 1 expression on dog erythrocytes analyzed by immunochromatographic and flow cytometric techniques**. *J Vet Intern Med*. 2014; 28:592-598.
4. Agnoli, C., Dondi, F., (2015). **Terapie trasfusionali nel cane parte II. Indicazioni cliniche, valutazioni pre-trasfusionali, modalità di somministrazione e reazioni avverse**. *Veterinaria*, anno 29, No. 5, Ottobre 2015
5. Aguirre E., Sainz A., Dunner S., (2004). **First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Spain**. *Vet Parasitol*. 2004 Nov 10;125(3-4):365-72.

6. Alberdi, M.P., Walker, A.R., and Urquhart, K.A. (2000). **Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*.** *Epidemiol. Infect.* 124, 315–323. doi:10.1017/S0950268899003684
7. Alleman A, Chandrashekar R, Beall M, et al. (2006). **Experimental inoculation of dogs with a human isolate (NY18) of *Anaplasma phagocytophilum* and demonstration of persistent infection following doxycycline therapy.** *J Vet Intern Med.* 2006;20:763.
8. Alleman AR, Wamsley HL, Abbott J, et al. (2007). **Experimental *Anaplasma phagocytophilum* infection of dogs by intravenous inoculation of human and canine isolates and treatment with doxycycline.** *Vet Pathol.* 2007;44:19.
9. Allison, R.W., Little, S.E. (2013). **Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats.** *Vet Clin Pathol.* 2013 Jun;42(2):127-44. doi: 10.1111/vcp.12040. Epub 2013 Apr 23.
10. Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., et al. (2016). **Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*.** *PLoS Negl Trop Dis* 10(2):e0004458
11. Andrade, B.B., De Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., et al. (2007). **Role of sandfly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights.** *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 122–127.
12. Andrade, R.A., Araujo, M.S.S., Reis, A.B., et al., (2008). **Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128 (2009) 79-86.
13. André MR., Adania CH., Machado RZ., et al., (2010), **Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids.** *J Wildl Dis.* 2010 Jul;46(3):1017-23.
14. Andrews, G.A. (2006). **Red blood cell antigens and blood groups in the dog and cat.** In: Feldman, BF, ; BF, ; Zinkl, JG, ; Jain, NC., editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5 th. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins ; 2006. P.767 – 773
15. Ashall, V. (2009). **Canine Blood Donor.** *In Practice*, 2009 31 : 257.

16. Aureli,S., Foley,J.E., Galuppi,R. et al. (2012). **Anaplasma phagocytophilum in ticks from parks in the Emilia-Romagna region of the northern Italy.** *Veterinaria Italiana*,2012, 48(4),413-423
17. Bakken JS1, Dumler S. (2008). **Human granulocytic anaplasmosis.** *Infect Dis Clin North Am.* 2008 Sep;22(3):433-48, viii. doi: 10.1016/j.idc.2008.03.011.
18. Baneth G., (2011). **Perspectives on canine and feline hepatozoonosis.** *Vet Parasitol.* 2011 Sep 8;181(1):3-11. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.015. Epub 2011 Apr 19.
19. Baneth, G. (2006). **Hepatozoonosis.** *In: Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed., C. E. Greene (ed.) W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 698-705, 2006.*
20. Baneth, G. (2011). **Perspectivte on canine and feline hepatozoonosis.** *Veterinary Parasitology* 181(2011) 3-11
21. Baneth, G., Bourdeau, P., Bourdoiseau, G., et al. CVBD World Forum. (2012). **Vector - borne diseases - constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum.** *Parasites & Vectors*, 5(1), 55.
22. Baneth,G., Mathew,J.S., Shkap, V., et al. (2003) **Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate Hepatozoon species.** *Trends Parasitol.* 19,27-31.
23. Baneth,G., Samish, M., Shkap, V. (2007). **Life cycle of Hepatooon canis (Apicomplexa: Adeleorina : hepatozoidae) in the tick Rhipicephalus sanguineus and domestic dog (Canis familiaris).** *J Parasitol.* 93, 283-299
24. Baneth,G.,Florin-Christensen,M., Cardoso, L., Schnittger, L.(2015). **Reclassification of Theileria annae as Babesia vulpes sp. nov.** *Parasit Vectors.* 2015;8:207.
25. Baráková,I.,Derdáková,M.,Carpi,G., et al. (2014). **Genetic and ecologic variability among Anaplasma phagocytophilum strains,northern Italy.** *Emerg.Infect.Dis.* 20,1082–1084.doi:10.3201/eid2006.131023
26. Barandika,J.F.,Hurtado,A.,García-Esteban,C.,et al.(2007).**Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals In northern Spain.** *Appl.Environ.Microbiol.* 73,6166–6171.doi:10.1128/AEM.00590-07

27. Barber, A.F., Al-Khedery, B., Stuenkel, S., et al. (2013). **An emerging tick -borne disease of humans is caused by a subset of strains with conserved genome structure.** *Pathogens*, 2, 544-555.
28. Barta, J.R. (2001). **Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites.** *Vet. Parasitol.* 101, 175-186
29. Barth, C., Straubinger, R.K., Muller, E., et al. (2014). Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 43/2(2014)180-184
30. Bayard-Mc Neeley, M., Bansal, A., Chowdhury, I., Girao, G., Small, C. B., Seiter, K., et al. (2004). **In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis.** *J. Clin. Pathol.* 57, 499–503. doi: 10.1136/jcp.2003.011775
31. Beall, M. J., Chandrashekar, R., Eberts, M. D., Cyr, K. E., Diniz, P. P., Mainville, C., et al. (2008). **Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota.** *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 455–464. doi: 10.1089/vbz.2007.
32. Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., et al. (2008). **Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function.** *PLoS ONE* 3:e3987. doi:10.1371/journal.pone.0003987
33. Beck R., Vojta L., Mrljak V., (2009). **Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia.** *Int J Parasitol.* 2009 Jun;39(7):843-8.
34. Belinchòn-Lorenzo, S., et al., (2012). **Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis.** *Vet. Parasitol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.007>
35. Benkova, I., Volf, P. (2007). **Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae).** *J Med Entomol* 2007; 44: 150–154 PMID
36. Beugnet, F., Loukos, H., Chalvet-Monfray, K., (2008). **FleaTickRisk: a climatic model developed to monitor and predict the activity and the density of 3 ticks species and the cat flea in France.** In: *Proceedings of the EMOP X, Paris.*

37. Beugnet, F., Mariè, J.L. (2009). **Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe.** *Veterinary Parasitology* 163 (2009) 298–305
38. Biagi G., Nannipieri S., Marzotto G., et al. (2009). **Medicina Trasfusionale in Ambito Veterinario.** *La Settimana Veterinaria - Fascicolo* 636, 5,6,8.
39. Birkenheuer, A.J., Correa, M.T., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B.(2005). **Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000–2003).** *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:942–7.
40. Birkenheuer, A.J., Correa, M.T., Levy, M.G., et al.(2005). **Geographic**
41. Birkenheuer, A.J., Neel, J., Ruslander, D., et al. (2004). **Detection and molecular characterization of a novel large Babesia species in a dog.** *Vet Parasitol.* 2004;124:151–60.
42. Blais, MC., Berman, L., Oakley, DA., et al. (2007). **Canine Dal blood type : a red cell antigen lacking in some Dalmatians.** *J Vet Intern Med* 2007 ; 21 : 2811 -6
43. Blais,M.C., Rozanski, E.A., Hale, A.S. et al. (2009). **Lack of evidence of pregnancy -induced alloantibodies in dogs.** *J Vet Intern Med.* 2009 ; 23 : 462 – 465.
44. Blađarová,L.,Stanko,M.,Carpi,G.,et al.(2014).**Distinct Anaplasma phagocytophilum genotype associated with Ixodes trianguliceps ticks and rodents in Central Europe.** *TicksTickBorneDis.* 5,928–938.doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.012
45. Blois, S. L., Richardson, D. M., & Abrams-Ogg, A. C. G. (2013). **Comparison of a gel column blood typing method and a point-of-care cartridge for dog erythrocyte antigen 1.1.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex. : 2001)*, 23(3), 340–343.
46. Boggiatto, P.M., Jie, F., Ghosh, M.,et al. (2009). **Altered dendritic cell phenotype in response to Leishmania amazonensis amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK.** *Am. J. Pathol.* 174:1818 –1826.
47. Boozer AL., (2003). **Canine babesiosis.** *Vet Clin North Am Small Anim*
48. Borjesson DL, Kobayashi SD, Whitney AR, et al. (2005) . **Insights into pathogen immune evasion mechanisms: Anaplasma phagocytophilum fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils.** *J Immunol* 2005;174:6364–6372. 101.

49. Bostrom ,B., Wolf, C., Greene, C., et al.(2008). **Sequence conservation in the rRNA first internal transcribed spacer region of Babesia gibsoni genotype Asia isolates.** *Vet Parasitol* 2008;152:152–7.
50. Bourdoiseau, G. (2006.) **Canine babesiosis in France.** *Vet. Parasitol.* 138, 118–125
51. Bown,K.J.,Begon,M.,Bennett,M.,et al. (2003). **Seasonal dynamics of Anaplasma phagocytophila in a rodent-tick(Ixodes trianguliceps) system, United Kingdom.** *Emerg.Infect.Dis.* 9,63–70.doi: 10.3201/eid0901.020169
52. Bown,K.J.,Lambin,X.,Ogden,N.H.,etal.(2009).**Delineating Anaplasma phagocytophilum ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles.** *Emerg.Infect.Dis.* 15,1948–1954.doi:10.3201/eid1512.090178
53. Bown,K.J.,Lambin,X.,Telford,G.R., et al.(2008).**Relative importance of Ixodes ricinus and Ixodes trianguliceps as vectorsf or Anaplasma phagocytophilum and Babesia microti in fieldvole (Microtus agrestis) populations.** *Appl.Environ.Microbiol.* 74,7118–7125.doi: 10.1128/AEM.00625-08
54. Bracker, K.E., Drellich, S. (2005). **Transfusion reactions.** *Compendium* 2005; 501 -12
55. Braga Mdo, S., André M.R, Freschi C.R., et al. (2012). **Molecular and serological detection of Ehrlichia spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil.** *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012 Jan-Mar;21(1):37-41.
56. Bragg, R.F., Duffy,A.L., De Cecco, F.A.,et al.(2012). **Clinical evaluation of a single dose of immune plasma for treatment of canine parvovirus infection.** *J Am Vet Med Assoc* 2012, 240:700–4.
57. Bremer,W.G.,Schaefer, J.J.,Wagner, E.R., et al. (2005). **Transtadial and intrastadial experimental transmission of Ehrlichia canis by male Rhipicephalus sanguineus.** *Vet Parasitol* 2005, 131:95-105.
58. Brooks, M.B. (2012). **Transfusion of plasma products.** *Ln: Schalm's veterinary hematology, , 6thedition.* Wiley Blackwell, Iowa (USA), 2012, pp. 744 -750
59. Brownlee, L., Wardrop, K.J., Sellon, R.K., Meyers, K.M.(2000) **Use of a Prestorage Leukoreduction Filter Effectively Removes Leukocytes from Canine Whole Blood While Preserving Red Blood Cell Viability.** *J Vet Intern Med* 2000,14:412–7.

60. Bruce, J.A., Kriese – Anderson, L., Bruce, A.M. et al. (2015). **Effect of pre-medication and other factors on the occurrence of acute transfusion reaction in dogs.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 00 (0): 1 -10, 2015.
61. Callan, MB., Patel, RT., Rux, AH., et al. (2013). **Transfusion of 28-day-old leucoreduced or non-leucoreduced stored red blood cells induces an inflammatory response in healthy dogs.** *Vox Sang* 105, 319–327.
62. Camacho, A.T., Guitian, F.J., Pallas, E., et al.(2004). **Azotaemia and mortality among Babesia microti like infected dogs.** *J Vet Intern Med* 2004;18:141–6.
63. Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J., et al. (2003). **Ixodes hexagonus is the main candidate as vector of Theileria annae in northwest Spain.** *Vet Parasitol.* 2003;112:157–63
64. Camacho-Garcia,A.T. (2006). **Piroplasma infection in dogs in northern Spain.** *Vet Parasitol.* 2006;138:97–102.
65. Cao, W. C., Zhao, Q. M., Zhang, P. H., Yang, H., Wu, X. M., Wen, B. H., et al. (2003). **Prevalence of Anaplasma phagocytophila and Borrelia burgdorferi in Ixodes persulcatus ticks from northeastern China.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*68, 547–550.
66. Capelli G1, Ravagnan S, Montarsi F, et al.(2012) **Occurrence and identification of risk areas of Ixodes ricinus-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy.** *Parasit Vectors.* 2012 Mar 27;5:61. doi: 10.1186/1756-3305-5-61.
67. Carcy,B., Randazzo, S., Depoix, D., et al. (2015). **Classification of Babesia canis strains in Europe based on polymorphism of the Bc28.1–gene from the Babesia canis Bc28 multigene family.** *Vet Parasitol* 2015, doi:10.1016/j.vetpar.2015.05.028
68. Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., et al. (2004). **Sero-epidemiological study of canine Leishmania spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal).***Vet Parasitol.* 2004 May 7;121(1-2):21-32.
69. Cardoso, L., Ysaschar-Mezukas, Y., Rodrigues, F.T., et al (2010). **Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector - borne co-infections.** *Parasite Vector* 8,27

70. Carli, E., Gerou-Ferriani, M. (2013). **Trasfusione sanguigna nella pratica veterinaria.** In *EV (Ed.), Manuale di ematologia veterinaria e medicina trasfusionale* (pp. 29–39)
71. Carli,E., Capello, K., Carminato, A., et al. (2015). **Frequenza dell’espressione dell’antigene eritrocitario DEA 1 nel cane.** *Atti del Congresso Internazionale SCIVAC, Rimini (Italy), 29-31 maggio 2015.*
72. Carlyon JA, Fikrig E. (2006).**Mechanism of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*.** *Curr Opin Hematol* 2006;13:28–33. 95.
73. Carrade,D.D., Foley,J.E., Borjesson, D.L. et al. (2009). **Canine Granulocytic Anaplasmosis : A review.** *J Vet Intern Med* 2009; 23:1129-1141
74. Carrade,D.D.,Foley,J.E.,Borjesson,D.L.,and Sykes,J.E.(2009).**Canine granulocytic anaplasmosis: a review.** *J.Vet.Intern.Med.Am.Coll.Vet.Intern. Med.* 23,1129–1141.*doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0384.*
75. Carret, C., Delbecq, S., Labesse, G., et al.(1999). **Characterization and molecular cloning of an adenosine kinase from *Babesia canis rossi*.** *Eur J Biochem.* 1999;265:1015–21.
76. Cassini, R., Zanutto, S., Di Regalbono, A.F., et al. (2009). **Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts.** *Vet Parasitol* 2009, 165:30-35
77. Castagnaro, M., Crotti, A., Fondati, A., Gradoni, L., Lubas, G., et al., (2007). **Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico.** *Veterinaria* 2007, 21 (3) 19-32
78. Ceretelli, S., Lubas, G., et al. (2012) **Medicina Umana – Medicina Veterinaria : risultati preliminari di uno studio congiunto.** *Ln. 40° Congresso SIMTI, s312 – s313, May 2012*
79. Chamailè, L., Tran,A., Meunier, A., et al., (2010). **Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France.** *Parasit Vectors.* 2010 Apr 8;3:31. *doi: 10.1186/1756-3305-3-31.*
80. Chambers, G.(2013). **Treatment of Afibrinogenemia in a Chihuahua.** *J Amer Anim Hosp Ass* 2013, 49:70-4.

81. Chastagner,A.,Bailly,X.,Leblond,A.,Pradier,S.,andVourc'h,G.(2013).**SingleGenotype of Anaplasma phagocytophilum Identified from Ticks ,Carmargue, France.** *Emerg.Infect.Dis.* 19,825–826.doi:10.3201/eid1905.12100
82. Chaudhuri, S., Varshney, J.P., Patra, R.C.(2008). **Erythrocytic antioxidant defence, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with Babesia gibsoni.** *Res Vet Sci* 2008;85:120–4.
83. Chauvet,S.(2004). **Etude Dynamique des Populations de Tiques Dans des Élevages Bovins en Corrèze.** *DV Mthesi Ecole Nationale Vétérinaire,Agroalimentaire et del'Alimentation,Nantes.*
84. Chen,G.,Severo,M.S.,Sohail,M., et al.(2012). **Ixodes scapularis saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during Anaplasma phagocytophilum stimulation of immune cells.** *Parasit.Vectors* 5:229.doi:10.1186/1756–3305-5-229
85. Chiaramonte, D. (2004). **Blood-component therapy : selection, administration and monitoring.** *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 19(2), 63–7.
86. Choi,K.S., Park,J.T., Dumler,J.S. (2005). **Anaplasma phagocytophilum delay of neutrophil apoptosis through the p38 mitogen-activated protein kinase signal pathway.** *Infect.Immun.*73,8209-8218.
87. Choi,K.S.,Garyu,J.,Park,J.,and Dumler,J.S.(2003).**Diminished adhesion of Anaplasma phagocytophilum infected neutrophils to endothelial cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin.** *Infect. Immun.* 71, 4586–4594.doi:10.1128/IAI.71.8.4586-4594.2003
88. Choi,K.S.,Grab,D.J.,and Dumler,J.S.(2004). **Anaplasma phagocytophilum infection induces protracted neutrophil degranulation.** *Infect.Immun.* 72, 3680–3683.doi:10.1128/IAI.72.6.3680-3683.2004
89. Colwell, D.D., Dantas –Torres, F., Otranto, D.(2011). **Vector –borne parasitic zoonosis : emerging scenarios and new perspectives.** *Veterinary Parasitology*, 182, 14 – 21
90. Costa, L.M., Rembeck, K., Ribeiro, M.F.B., et al. (2007).**Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil.** *The Veterinary Journal* Volume 174, Issue 3, November 2007, Pages 673–676

91. Cotter, S. (1991). **History of transfusion medicine.** *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 36, 1–8.
92. Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., et al. (2005). **Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis.** *Vet Parasitol* 2005, 128:149-155.79.
93. Craft, EM., Powell, LL. (2012). **The use of canine-specific albumin in dogs with septic peritonitis.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 22(6) 2012, pp 631-639.
94. Crawford K., Walton J., Lewis D., et al (2013). **Infectious agent screening in canine blood donors in the United Kingdom.** *J Small Anim Pract.* 2013 Aug;54(8):414-7. doi: 10.1111/jsap.12109.
95. Crawford, K., Walton, J., Lewis, D., Tasker, S., Warman, SM. (2013). **Infectious agent screening in canine blood donors in the United Kingdom.** *Journal Of Small Animal Practice*, 54 (2013), 414- 417
96. Criado-Fornelio, A., Buling, A., Cunha-Filho, N.A., et al. (2007). **Development and evaluation of a quantitative PCR assays for detection of Hepatozoon spp.** *Vet. Parasitol.*150. 352-356
97. Dabaghmanesh, T., Asgari, Q., Moemenbellah-Fard, M. D., et al. (2016). **Natural transovarial and transstadial transmission of Leishmania infantum by naïve Rhipicephalus sanguineus ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran.** *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 408-413.
98. Dantas – Torres, F. (2010). **Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus.** *Parasites & Vectors* 2010, 3:26
99. Dantas-Torres, F. (2007). **The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis.** *Vet. Parasitol.* 149:139–146
100. Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., et al. (2010). **Detection of Leishmania infantum in Rhipicephalus sanguineus ticks from Brazil and Italy.** *Parasitol Res.* 2010;106(4):857–860.
101. Dantas-Torres, F., Melo, M.F., Figueredo, L.A., et al. (2009) **Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil.** *Rev Bras Parasitol Vet* 2009, 18:75-77.
102. Dantas-Torres, F. (2008). **The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus**

- (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol* 2008,63 152:173-185.
103. Davidow, B. (2013). **Transfusion medicine in small animals.** *Vet Clin Small Anim* 43 (2013),735 – 756 .
 104. Dawson, J.E., Stallknecht,DE., Howerth , EW., et al. (1994). **Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with Ehrlichia chaffeensis, the etiologic agent of human ehrlichiosis.** *J. Clin. Microbiol.* November 1994 vol. 32 no. 11 2725-2728
 105. De Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P., et al.,(2005). **Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors.** *Veterinary Parasitology* 137 (2006) 159-167
 106. De Luca, LA., Glass, S., Johnson, RE. (2006). **Description and Evaluation of a Canine Volunteer Blood Donor Program.** *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 9(2), 129 - 141
 107. Dingle RJ, Wright SA, Donohue AM.,et al (2014) . **Surveillance for Ixodes pacificus and the tick-borne pathogens Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi in birds from California's Inner Coast Range.** *Ticks Tick Borne Dis.* 2014 Jun;5(4):436-45. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.02.002. Epub 2014 Mar 30.
 108. Diniz PP., Beall MJ, Omark K,(2010). **High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in northeastern Arizona.** *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010 Mar;10(2):117-23. doi: 10.1089/vbz.2008.0184.
 109. **Distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003).** *J Am Vet Med Assoc.* 2005 Sep DOI: 10.1186/s13071-015-0649-0
 110. Donadee, C., Raat,N.J. Kanias, T. et al. (2011). **Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion.** *Circulation*, 124 : 465 – 476, 2011.
 111. Dugan, V. G., Yabsley, M. J., Tate, C. M., Mead, D. G., Munderloh, U. G., Herron, M. J., et al. (2006). **Evaluation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) as natural sentinels for Anaplasma phagocytophilum.** *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 192–207. doi: 10.1089/vbz.2006.6.192
 112. Dugat,T.,Chastagner,A.,Lagrée,A.-C. et al.(2014a).**A new multiple-locus**

- variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants.** *Parasit.Vectors* 7:439.doi:10.1186/1756-3305-7-43
113. Nyarkoa, D.J. Graba, J.S. Dumlerb,(2006). **Anaplasma phagocytophilum-infected neutrophils enhance transmigration of *Borrelia burgdorferi* across the human blood brain barrier in vitro.** *International Journal for Parasitology, Volume 36, Issue 5, May 2006, Pages 601–605*
114. Ebani V1, Cerri D, Fratini F, Ampola M, Andreani E.(2008). **Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy.** *New Microbiol.* 2008 Jul;31(3):371-5.
115. Ebani VV1, Verin R, Fratini F, Poli A, Cerri D. (2011). **Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from central Italy.** *J Wildl Dis.* 2011 Jul;47(3):699-703.
116. Ebani, V.V., Bertelloni, F., Torracca, B., Cerri, D. (2014). **Serological survey of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia canis* infections in rural and urban dogs in Central Italy.** *Ann Agric Environ Med.* 2014;21(4):671–5.
117. Eberts, M.D., Vissotto de Paiva Diniz, P.P., Beall,M.J., et al. (2011). **Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs.** *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011 Nov-Dec;47(6):e86-94. doi: 10.5326/JAAHA-MS-5578.
118. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), (2015). **Scientific Opinion on canine leishmaniosis.** *EFSA Journal* 2015; 13(4):4075, 77 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4075
119. Engvall, A., Lilliehook, I., Bjoersdorff, A., Engvall, E. O., Karlstam, E., Artursson, K., et al. (2000). **Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs.** *Vet. Rec.* 146, 186–190. doi: 10.1136/vr.146.7.186
120. Ekiz,E.E., Arslan, M., Ozcan, M. et al. (2011) **Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 in 4 breeds native to different areas in Turkey.** *Vet Clin Pathol* 40, 518–523
121. Esch, K.J., Petersen, C.A. (2013).**Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Disease of Companion Animals.** *Clinical Microbiology Reviews, Vo.26, No.1, p.58-85*

122. Euler,C.C., Lee, H.Y., Kim, K., et al. (2016). **Survey of two new (Kai 1 and Kai 2) and other Blood Groups in dogs of North America.** *J Vet Intern Med* 2016; 30:1642 – 1647
123. Ferreira, R.R., Gopegui, R.R., Matos, A.J. (2011). **Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal.** *Vet Clin Pathol* 40, 198–201
124. Ferri, G. (16/12/2013). **Nota Ministero della Salute: Emoderivati ed emocomponenti – richiesta di chiarimenti in merito all'applicazione del D.Lgs. 193/2006 .** *Prot. N. 0024005-16/12/2013-DGSAF-COD_UO-P*
125. Ferroglio,E., Maroli, M., Gastaldo, S.,et al. (2005). **Canine leishmaniasis, Italy.** *Emerg Infect Dis* 2005, 11:1618-1620
126. Fischer, D., Moeller, P., Thomas, S.M., et al. (2011). **Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1407.
127. Foley, J., and Nieto, N. (2007). **Anaplasma phagocytophilum subverts tick salivary gland proteins.** *Trends Parasitol.* 23, 3–5. doi: 10.1016/j.pt.2006.10.003
128. Fourie JJ., Stanneck D., Luus HG. Et al. (2013)., **Transmission of Ehrlichia canis by Rhipicephalus sanguineus ticks feeding on dogs and on artificial membranes.** *Vet Parasitol.* 2013 Nov 8;197(3-4):595-603. doi: 10.1016/j.vet-par.2013.07.026. Epub 2013 Aug 3.
129. Franzen,P., Berg,A.L., Aspan,A., et al. (2007). **Death of a horse infected experimentally with Anaplasma phagocytophilum.** *Vet.Rec.*160,122-125
130. Fritz D. (2010). **A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008).** *Parasitol Res.* 2010;106:1339–42.
131. Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., Xuan, X (2005).**Fatal experimental transplacental Babesia gibsoni infections in dogs.** *Int J Parasitol.* 2005;35:1031–5.
132. Furlanello, T. et al. (2005) **Clinico-pathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy.** *Vet. Parasitol.* 134, 77–8
133. Gal, A., Harrus, S., Arcoh, L., et al. (2007). **Co-infection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6 week-old-dog.** *Can. Vet. J.* 48,619-622

134. Garcia-Garcia JC, Rennoll-Bankert KE, Pelly S, et al. (2009) **Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector AnkA of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*.** *Infect Immun* 2009;77:2385–2391. 96.
135. Garibyan, L., Avashia, N., (2013). **Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR).** *J Invest Dermatol.* 2013 March;133(3): e6. doi:10.1038/jid.2013.1.
136. Garyu JWA, Choi KS, Grab DJ, et al. (2005). **Defective phagocytosis in *Anaplasma Phagocytophilum*-infected neutrophils.** *Infect Immun* 2005;73:1187–1190.
137. Gaunt, S., M. Beall, B. Stillman, L. Lorentzen, P. Diniz, R. Chandrashekar, and E. Breitschwerdt. (2010). **Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings.** *Parasit & Vectors* 3:33.
138. Gavazza, A., (2008). **Una Linea Guida che ci qualifica .** *La Professione Veterinaria*, 10/2008
139. Gavazza, A., Bizzeti, M., Papini, R. (2003). **Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy.** *Revue Med. Vet.* 154,565-571
140. Geiger, T.L., Howard, S.C. et al (2007). **Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile non – hemolytic transfusion reactions : good prophylaxis or bad practice.** *Transfus Med Rev* 2007; 21 (1): 1-12
141. Giangrande, PLF., (2000). **The History Of Blood Transfusion.** *British Journal Of Haemathology*, 2000, 110, 758 – 767.
142. Giger, U. (2009). **Transfusion Medicine.** In Elsevier (Ed.) *Small animal Critical Care Medicine* (pp. 281-286)
143. Giger, U., Acierno, M., Euler, C., Kim, H.Y., et al. (2016). **Blood Typing and Blood Compatibility Testing in dogs.** *ACVIM Forum, Denver, Colorado* 18-11 June, 2016
144. Giger, U., Acierno, M.A., Polak, K. et al. (2013). **Updates on canine and feline blood typing and crossmatching.** *15th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Clinical pathology ESVCP/ ECVCP Proceeding* : 108 – 113, 2013.

145. Giger, U., Jackson, K.V., Weinstein, N.M., et al. (2007). **Feline blood typing and crossmatching to ensure blood compatibility : how to avoid hemolytic transfusion reactions and neonatal isoerythrolysis.** *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine ; Seattle, USA, 2007.*
146. Giger,U. (2015). **Transfusion Therapy.** *Ln : Silverstein DC, Hopper K. Eds. Small Animal Critical Care Medicine. Second edition. St.Louis,Missouri ; Elsevier, 2015, pp 327- 332*
147. Giger,U., Stieger, K., Palos,H. (2005) **Comparison of various canine blood – typing methods.** *Am J Vet Res 2005 ; 66 : 1386 - 1392*
148. Goff,W.L., Johnson,W.C., Parish, S.M., et al. (2001). **The age-related immunity in cattle to Babesia bovis infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen.** *Parasite Immunol. 23:463– 471.*
149. Gohil, S., Kats, L.M., Sturm, A., Cooke, B.M.. (2010). **Recent insights into alteration of red blood cells by Babesia bovis: moovin’ forward.** *Trends Parasitol. 26:591–599.*
150. Gotsch,S., Leschnik,M., Duscher, G., et al. (2009). *Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde . Vet. Parasitol.166,171-174*
151. Graf, C., Raila, J., Schweigert, FJ., et al. (2012). **Effect of leukoreduction treatment on vascular endothelial growth factor concentration in stored canine blood transfusion products.** *AJVR, Vol. 73, No, 12, December 2012*
152. Gramiccia M., Gradoni L.(2005). **The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control.** *Int J Parasitol. 2005 Oct;35(11-12):1169-80.*
153. Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., et al. (2013). **The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009.** *Euro Surveill 2013; 18: 20535*
154. Granick,J.L.,Reneer,D.V.,Carlyon,J.A.,andBorjesson,D.L.(2008).**Anaplasma phagocytophilum infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production.** *J.Med.Microbiol. 57, 416–423.doi:10.1099/jmm.0.47551-0*

155. Granquist, E. G., Stuen, S., Lundgren, A. M., Braten, M., and Barbet, A. F. (2008). **Outer membrane protein sequence variation in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*.** *Infect. Immun.* 76, 120–126. doi: 10.1128/IAI.01206-07
156. Granquist, E. G., Bardsen, K., Bergstrom, K., and Stuen, S. (2010b). **Variant and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection.** *Acta Vet. Scand.* 52.
157. Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., et al. (2010). **Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity.** *Ticks Tick Borne Dis.* 1:3–10.
158. Gray, J. S., Weiss, L. M., (2008) . ***Babesia microti*.** In: Khan, N. (Ed.), *Emerging Protozoan Pathogens*. Taylor and Francis, Abingdon, UK, pp. 303–349.
159. Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., et al. (2013) **Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.** *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4(3):171–80
160. Grochowsky, A. R., Rozanski, E. A., De Laforcade, A. M. et al. (2014).. **An ex vivo evaluation of efficacy of refrigerated canine plasma,** *J Vet Emerg Crit Care* 2014, 24:388–97.
161. Grzeszczuk, A., and Stanczak, J. (2006). **Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1078, 309–311. doi: 10.1196/annals.1374.057
162. Grzeszczuk, A., Karbowiak, G., Ziarko, S., and Kovalchuk, O. (2006). **The root-vole *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776): a new potential reservoir of *Anaplasma phagocytophilum*.** *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 240–243. doi: 10.1089/vbz.2006.6.240
163. Guitian, F. J., Camacho, A. T., Teford, S. R. III. (2003). **Case-control study of canine infection by a newly recognised *Babesia microti*-like piroplasm.** *Prev Vet Med* 2003;61: 137–45.
164. Guo, X. Y., Booth, C. J., Paley, M. A., et al. (2009). **Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins.** *Infect. Immun.* 77, 2320–2329. doi:10.1128/IAI.01507-08

165. Guzman, L.R., Streeter, E., Malandra, A. (2016). **Comparison of a commercial blood cross – matching kit to the standard laboratory method for establishing blood transfusion compatibility in dogs.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 26(2), 2016, pp 262 – 268
166. Hale, A.S., Werfelmann, J., Lemmons, M., Smiler, B. et al.. (2008). **An evaluation of 9,570 dogs by breed and dog erythrocyte antigen typing [abstract].** *J Vet Intern Med.* 2008; 22 : 740
167. Hann, L., Brown, D.C., King, L.G., Callan, M.B. (2014). **Effect of Duration of Packed Red Blood Cell Storage on Morbidity and Mortality in Dogs after Transfusion: 3,095 cases (2001–2010).** *J Vet Intern Med* 2014, 28:1830–7.
168. Harrus, S.T., Waner, D., Friedmann-Morvinski, Z., et al. (2003). **Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with Ehrlichia canis.** *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96:239–243
169. Hayden, S.J., Albert, T.J., Watkins, T.R. et al. (2012). **Anemia in critical illness: in-sights into etiology, consequences, and management.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185, (10) : 1049 – 1057, 2012.
170. Heine, S., Thiet, W., Liebisch, G. (2007). **Anaplasmosis beim Hund-Fallbericht.** *Prakt. Tierarzt* 88, 20-27.
171. Heinze, D.M., Carmical, J.R., Aronson, J.F., and Thangamani, S. (2012). **Early immunologic events at the tick-host interface.** *PLoS ONE* 7:e47301. doi:10.1371/journal.pone.0047301
172. Hildebrandt, A., Schmidt, K. H., Fingerle, V., Wilske, B., and Straube, E. (2002). **Prevalence of granulocytic Ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment.** *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 225–230. doi: 10.1111/j.15746968.2002.tb11229.x
173. Hod, E.A., Zhang, N., Sokol, S.A., et al. (2010). **Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation.** *Blood* 115 : 4284 – 4292, 2010
174. Hoenhaus, A.E., Renko, V. (2006). **Blood transfusions and blood substitutes,** Ln : Di Bartola, S.P. Ed. *Fluid Therapy in Small Animal Practice*, 3rd ed. St. Louis, MO : Saunders; 2006, pp. 574 – 581.

175. Hohnnehaus, A.E. (2004). **Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animal**. *Transfus Med Rev* 2004; 18 : 117 – 26
176. Holman, M. S., Caporale, D. A., Goldberg, J., Lacombe, E., Lubelczyk, C., Rand, P. W., et al. (2004). **Anaplasma phagocytophilum, Babesia microti, and Borrelia burgdorferi in Ixodes scapularis, southern coastal Maine**. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 744–746. doi: 10.3201/eid1004.030566
177. Holst, L.B., Haase, N., Wetterseiv, J. et al (2015). **Should red blood cell transfusion be individualized?** *No. Intensive Care Medicine* (41) 11:1977 - 1979, 2015
178. Hosgood, G. (1991). **Blood transfusion: a historical review**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197(8), 998–1000.
179. Iazbik, M.C., O'Donnell, M., Marin, L. et al. (2010) **Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing greyhounds**. *Vet Clin Pathol* 39, 433–435
180. Inokuma H., Okuda M., Ohno K. et al., (2002) **Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs**. *Vet Parasitol.* 2002 Jun 26;106(3):265-71.
181. Inokuma, H., Okuda, M., Yoshizaki, Y., et al. (2005). **Clinical observations of Babesia gibsoni infections with low parasitaemias confirmed by PCR in dogs**. *Vet Rec* 2005;156: 116–8.
182. Irwin, P.J. (2009). **Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control**. *Parasit Vectors.* 2009;2 Suppl 1:S4.
183. Ivanov, A., Tsachev, I. (2008). **Hepatozoon canis and hepatozoonosis in the dog**. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 6, No. 2, pp27-35, 2008 Copyright © 2008 Trakia University
184. Jacobson, L.S. (2006). **The South-African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004**. *Vet. Parasitol.* 138, 126–139
185. Jacobson, L.S. et al. (1996). **Changes in haematocrit after treatment of uncomplicated canine babesiosis: a comparison between diminazene and trypan blue, and an evaluation of the influence of parasitaemia**. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 67, 77–82
186. Jaenson, T.G.T., Jaenson, D.G.E., Eisen, L., et al. (2012). **Changes in the geographical distribution and abundance of the tick Ixodes ricinus during the past 30 years in Sweden**. *Parasit. Vectors* 5:8. doi:10.1186/1756-3305-5-8

187. Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., et al. (2007). **Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of Babesia gibsoni in dogs.** *Aust Vet J.* 2007;85:459–63.
188. Jenkins, A., Kristiansen, B.E., Alum, A.G., et al. (2001). **Borrelia burgdorferi sensu lato and Ehrlichia spp. In Ixodes ticks from southern Norway.** *J Clin. Microbiol.* 39, 3666-3671
189. Jensen, J., Simon, D., Murua Escobar, H., et al. (2007). **Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany.** *Zoonoses Public Health* 54, 94–101.
190. Jore, S., Vanwambeke, S.O., Viljugrein, H., Isaksen, K. et al. (2014). **Climate and environmental change drives Ixodes ricinus geographical expansion at the northern range margin.** *Parasit. Vectors* 7:11. doi:10.1186/1756-3305-7-11
191. Jore, S., Viljugrein, H., Hofshagen, M., et al. (2011). **Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of Ixodes ricinus at its northern distribution limit.** *Parasit. Vectors* 4:84. doi:10.1186/1756-3305-4-8
192. Kamhawi, S. (2000). **The biological and immunomodulatory properties of sandfly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections.** *Microbes and Infection*, 2, 1765–1773.
193. Karagenc, T.I., Pasa, S., Kirli, G., et al. (2006). **A parasitological, molecular and sierological survey oh Hepatozoon canis infection in dogs around the Aegean coasts of Turkey.** *Vet. Parasitol.* 135, 113-119.
194. Kessler, R.J., Reese, J., et al. (2010). **Dog erythrocyte antingens 1.1, 1.2, 3, 4, 7 and Dal blood typing and cross-matching by gel column technique.** *Vet Clin Pathol* 2010 September; 39 (3): 306 -316.
195. Kirtz, G., Meli, M., Leidinger, E., et al (2005). **Anaplasma phagocytophilum infection in a dog: identifying the causative agent using PCR.** *Journal of Small Animal Practice Volume* 46, Issue 6, June 2005, Pages 300–303
196. Kisielewicz, C., & Self, I. a. (2014). **Canine and feline blood transfusions: controversies and recent advances in administration practices.** *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 1–10
197. Kjemtrup AM1, Wainwright K, Miller M. et al., (2006). **Babesia conradae, sp. Nov., a small canine Babesia identified in California.** *Vet Parasitol.* 2006 May 31;138(1-2):103-11. Epub 2006 Mar 9.

198. Kořster, L.S., Van Schoor, M., Goddard, A., et al.(2009) **C-reactive protein in canine babesiosis caused by Babesia rossi and its association with outcome.** *J S Afr Vet Assoc* 2009;80(2):87–91.
199. Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K.(2011). **Infections with Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany.** *Res Vet Sci.* 2011;91(1):71–6
200. Kohn, B., Classe, G., Weingart, C., (2012). **Clinical evaluation of the QuickVet®/ RapidVet® canine dog erythrocyte antigen 1.1 blood – typing test.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24 (3) 539 - 545
201. Kohn,B., Galke,D., Beelitz, P., et al. (2008). **Clinical Features of Canine Granulocytic Anaplasmosis in 18 Naturally Infected Dogs.** *J Vet Intern Med,* Volume 22, Issue 6, November–December 2008 Pages 1289–1295
202. Komnenou AA1, Mylonakis ME, Kouti V, et al. (2007). **Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a retrospective study of 90 cases.** *Vet Ophthalmol.* 2007 May-Jun;10(3):137-42.
203. Kostro,K., Stojcecki,K., Grzybek,M.,et al.(2015). **Characteristics, immunological events, and diagnostics of Babesia spp. infection, with emphasis on Babesia canis.** *Bull Vet Inst Pulawy* 59, 495-504, 2015
204. Kumar, A., Varshney, J.P., Patra, R.C.,. (2006). **A comparative study of oxidative stress in dogs infected with Ehrlichia canis with or without concurrent infection with Babesia gibsoni.** *Vet Res Commun* 2006;30:917–20.
205. Lai TH, Kamagai Y, Hayakawa Y, et al. (2009).**The Anaplasma phagocytophilum PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection.** *J Bacteriol* 2009;191:693–700.
206. Lanevski ,A., Wardrop , KJ., (2001). **Principles of transfusion medicine in small animals.** *Can Vet J* , 42(6), 447-541
207. Lappin, M. (2010). **Update on the diagnosis and management of Hepatozoon spp. Infections in dogs in the United States.** *Topics in Companion Animal Medicine, Volume 25, Number 3, August,2010.*
208. Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J.,et al. (2002). **Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors.** *Infect. Immun.* 70:826–835.

209. Lee HC, Kioi M, Han J, et al. **Anaplasma phagocytophilum** induced gene expression in both human neutrophils and HL-60 cells. *Genomics* 2008;92:144–151.
210. Lehtinen, L.E. et al. (2008). **In vitro cultivation of a newly recognized Babesia sp. in dogs in North Carolina.** *Vet. Parasitol.* 151, 150–157
211. Li, Y., Terkawi, M.A., Nishikawa, Y. (2012). **Macrophages are critical for cross-protective immunity conferred by Babesia microti against Babesia rodhaini infection in mice.** *Infect. Immun.* 80:311–320.
212. Li, Y., Wang, C., Allen, K.E., et al. (2008). **Diagnosis of canine Hepatozoon spp. Infection by quantitative PCR.** *Vet. Parasitol.* 157:50–58.
213. Lione, N., Crettaz, D., Rubins, O. et al. (2010). **Stored red blood cells : a changing universe waiting for its map (s).** *Journal of Proteomics* 73: 374 – 385, 2010
214. Lisi, O., D'Urso, V., Vaccalluzzo, V., et al. (2014). **Persistence of phlebotomine Leishmania vectors in urban sites of Catania (Sicily, Italy).** *Parasit Vectors* 2014; 9:560
215. Little SE. (2010). **Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010 Nov;40(6):1121–40. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.07.004.
216. Lobetti, R.G. (2006). **Babesiosis, in Infectious diseases of the dog and cat, 3rd ed., edited by C.E. Greene.** Philadelphia: W.B. Saunders.
217. Lommano, E., Dvořák, C., Vallotton, L., Jenni, L., and Gern, L. (2014). **Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland.** *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 871–882. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.00
218. Louly, C.C.B., Soares, S., Silveira, D. et al. (2009). **Differences in the susceptibility of two breeds of dogs, English cocker spaniel and beagle, to Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae).** *Inter J Acarol* 2009, 35:25–32.
219. Louly, C.C., Soares, S.F., Da Nóbrega Silveira, D., et al. (2010). **Differences in the behavior of Rhipicephalus sanguineus tested against resistant and susceptible dogs.** *Exp Appl Acarol* 2010 Aug;51(4):353–62.
220. Lubas, G. (2011). **Gruppi sanguigni e medicina trasfusionale.** In : *Il Campano (Ed.), Appunti di ematologia clinica veterinaria (pp.247–341)*

221. Lubas, G., Oliva, G., Antognoni, MT., et al. (2015) **Guida orientata alla trasfusione di sangue nel cane in Italia**. *Atti del Congresso Internazionale SCIVAC, RIminimi (Italy)*, 29 – 31 maggio 2015.
222. Mackin, A., (2013). **Practical Blood Transfusion** . *AAHA Conference*, 14 March 2013
223. Maggi, R.G., Birkenheuer, A., Hegarty, B.C., et al. (2014). **Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs**. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 127. Published online 2014 Mar 26. doi: 10.1186/1756-3305-7-127 PMID: PMC3972965
224. Maia, C., Campino, L., (2008). **Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection**. *Veterinary Parasitology* 158 (2008) 274-287
225. Maia, C., Cardoso, L., (2015). **Spread of Leishmania infantum in Europe with dog travelling**. *Veterinary Parasitology* 213 (2015) 2-11
226. Maia, C., Cardoso, L., 2015. **Spread of Leishmania infantum in Europe with dog travelling**. *Veterinary Parasitology* 213 (2015) 2-11
227. Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., et al. (2014). **Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal**. *Parasites & Vectors* 2014;7:115 DOI: 10.1186/1756-3305-7-115
228. Mancianti F., Meciani N. (1988) **Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis**. *Am J Vet Res*. 1988 Aug;49(8):1409-11.
229. Manilla, G. (1998). **Fauna d'Italia Vol. XXXVI Acari-Ixodida**. Edizioni Calderini, Bologna 1998.
230. Marchetti, V., Lubas, G., Baneth, G., et al. (2009). **Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis**. *Vet. Clin. Pathol*. 38, 121-125.
231. Marechal, F., Ribeiro, N., Lafaye, M., et al. (2008). **Satellite imaging and vector borne diseases: the approach of the French National Space Agency CNES**. *Geospatial Health* 3, 1–5.
232. Maresca, C., Scoccia, E., Barizzone, F., et al. (2009). **A survey on canine leishmaniasis and phlebotomine sand flies in central Italy**. *Res Vet Sci* 2009, 87:36-38

233. Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., et al. (2008). **The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors.** *Trop Med Int Health.* 2008;13(2):256–64.
234. Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., et al. (2013). **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern.** *Medical and Veterinary Entomology* (2013) 27, 123–147
235. Massung RF., Slater K., Owens JH., (1998). **Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae.** *J Clin Microbiol.* 1998 Apr;36(4):1090-5.
236. Masucci, M., Lombardo, G., Passantino, A., et al. (2011). **Revisione della Linea Guida del Ministero della Salute riguardante la medicina trasfusionale in campo veterinario sancita dall'accordo Stato-Regioni (20/12/2007).** *Bollettino AIVPA – Anno 2011/2012*
237. Materna J., Daniel, M., and Danielová, V. (2005). **Altitudinal distribution limit of the tick Ixodes ricinus shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic).** *Cent. Eur. J. Public Health* 13, 24–28
238. Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., et al. (2009). **Septic shock in canine babesiosis.** *Vet Parasitol* 2009;162:263–70.
239. Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., et al. (2007). **Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with Babesia canis.** *Vet Parasitol* 2007;144:242–50.
240. Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T.P. (2012). **Canine babesiosis in Europe: how many diseases?** *Trends in Parasitology* March 2012, Vol. 28, No. 3
241. Matsuu, A., Kawabe, A., Koshida, Y., et al. (2004). **Incidence of canine Babesia gibsoni infection and subclinical infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan.** *J Vet Med Sci* 2004;66(8):893–7.
242. McDevitt, R., Ruaux, C.G., et al. (2011). **Influence of transfusion technique on survival of autologous red blood cells in the dog.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 21(3)2011, pp209 – 216
243. McClure, J., Crothers, M.L., Schaefer, J.J., et al. (2010). **Efficacy of a Doxycycline Treatment Regimen Initiated during Three Different Phases of Experimental Ehrlichiosis.** *Antimicrob. Agents Chemother.* December 2010 vol. 54 no. 12 5012-5020

244. McMicheal, M. (2015). **Prevention and treatment of transfusion reactions.** *Ln : Silverstein DC, Hopper K. Eds Small Animal Critical Care Medicine. Second Edition. St Louis, Missouri: Elsevier,2015, pp. 333-337.*
245. Medlock,J.M.,Hansford,K.M.,Bormane,A.,et al.(2013).**Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe.** *Parasit.Vectors 6:1.doi:10.1186/1756-3305*
246. Meireles-Filho, A.C., Kyriacou,C.P.. (2013).**Circadian rhythms in insect disease vectors.** *Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108: 48–58*
247. Mekuzas, Y., Gradoni , L., Oliva, G., et al. (2009). **Ehrlichia canis and Leishmania infantum co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs.** *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 15 (Supl. 2), 30–31*
248. Melzer, K.J., Wardrop,K.J., Hale, A.S., Wong,V.M. (2003). **A hemolytic transfusion reaction due to DEA 4 alloantibodies in a dog.** *J Vet Intern Med 2003 ; 17 : 931 -933*
249. Menn, B., Lorentz,S., naucke, T.J. (2010). **Imported and travelling ddogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany.** *Parasite Vector 3,34.*
250. Meybohm, P., Shander,A., Zacharowski,K. (2015). **Should we restrict erythrocyte transfusion in early goal directed protocols?** *BioMed Central Anesthesiology, 2015*
251. Mierzejewska, E.J., Estrada-Pena, A., Alsarraf, M., et al. (2016). **Mapping of Dermacentor reticulatus expansion in Poland in 2012–2014.** *Ticks Tick Borne Dis. 2016;7:94–106.*
252. Mierzejewska, E.J., Welc-Faleciak, R., Bednarska,M,et al. (2014). **The first evidence for vertical transmission of Babesia canis in a litter of central Asian Shepherd dogs.** *Ann Agric Environ Med. 2014;21:500–3.*
253. Ministero della Salute. (2016). **Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario.** *Gazzetta ufficiale del 3 febbraio 2016, No. 25*
254. Miro, G., Checa, R., Paparini, A. et al.(2015). **Theileria annae (syn. Babesia microti-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases.** *Parasit Vectors. 2015;8:217.*

255. Moroff, S.1., Sokolchik, I.1., Woodring, T.1., et al. (2014). **Detection of antibodies against Anaplasma phagocytophilum in dogs using an automated fluorescence based system.** *Vet J.* 2014 Nov;202(2):348-52. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.08.018. Epub 2014 Aug 19.
256. Moulin,E.(2009).**Tiques Potentiellement Vectrices De L'anaplasmose Granulocytaire Équine en Camargue.** *DV Mthesis,Université Claude Bernard Lyon1,Ecole Nationale Vétérinaire deLyon,Marcy-l'Étoile.*
257. Mundim, A.V., Morais, I.A., Tavares, M., et al. (2008). **Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by Hepatozoon sp. And with other hematozoa : a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.** *Vet.Parasitol.* 153,3-8
258. Murase,T., Maede, Y. (1990). **Increased erythrophagocytic activity of macrophages in dogs with Babesia gibsoni infection.** *Jpn. J. Vet. Sci.* 52, 321–327
259. Nel, M., Lobetti, R.G., Keller, N., et al. (2004). **Prognostic value of blood lactate, blood glucose and hematocrit in canine babesiosis.** *J Vet Intern Med* 2004;18: 471–6.
260. Noli, C., Saridomichelakis, M.N., (2014). **An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by Leishmania infantum (syn. L. chagasi).** *The Veterinary Journal* 202 (2014) 425-435
261. Odunayo, A., Kerl, M.E. (2011). **Comparison of whole blood and plasma colloid osmotic pressure in healthy dogs.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 21 (3) : 236 -241, 2011.
262. Ognean, L., Moldovan, M., Cernea, C., et al. (2009). **Value of Crossmatch Tests for Verifying the Compatibility in dog blood transfusion therapy .** *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 66(1) 2009
263. Ohashi, N., Inayoshi, M., Kitamura, K., Kawamori, F., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., et al. (2005). **Anaplasma phagocytophilum infected ticks, Japan.** *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1780–1783. doi: 10.3201/eid1111.050407
264. Ojogun,N., Kahlon,A., Ragland,S. et al.(2012). **Anaplasma phagocytophilum outer membrane protein A interacts with** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* www.frontiersin.org July2013|Volume3|Article31 / 28

265. Otsuka, Y., Yamasaki, M., Yamato, O., et al.(2002). **The effect of macrophages on the erythrocytic oxidative damage and the pathogenesis of anemia in Babesia gibsoni-infected dogs with low parasitemia.** *J Vet Med Sci* 2002;64:221–6.
266. Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2010). **Canine and feline vector-borne diseases in Italy : current situation and perspectives.** *Parasites & Vectors* 2010 3 : 2
267. Otranto, D., Capelli, G., Genchi, C. (2009). **Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis.** *Parasit Vectors.* 2009;2 Suppl 1:S2
268. Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B.(2009). **Managing canine vector- borne diseases of zoonotic concern: part two.** *Trends Parasitol* 2009, 25:228-235
269. Otranto, D., Lia, R.P., Cantacessi, C., et al. (2005). **Efficacy of a combination of imidacloprid 10%/permethrin 50% versus fipronil 10%/(S)-methoprene 12%, against ticks in naturally infected dogs.** *Vet Parasitol* 2005, 130:293-304
270. Otranto, D., Wall, R., (2008). **New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats.** *Med. Vet. Entomol.* 22, 291–302.
271. Otranto, F., Dantas -Torres, F., Weigl, S., et al. (2011). **Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR.** *Parasites & Vectors*20114:55
272. Otranto,D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B.(2009) **Managing canine vector- borne diseases of zoonotic concern: part one.** *Trends Parasitol* 2009, 25:157-163.
273. Overzier, E., Pfister, K., Herb, I., Mahling, M., Böck, G. Jr., and Silaghi, C. (2013a). **Detection of tick-borne pathogens in roe deer (Capreolus capreolus), questing ticks (Ixodes ricinus) and ticks infesting roe deer in southern Germany.** *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 320–328. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.01.004
274. Overzier, E., Pfister, K., Thiel, C., Herb, I., Mahling, M., and Silaghi, C. (2013b). **Anaplasma phagocytophilum in questing Ixodes ricinus Ticks: comparison of prevalences and partial 16S rRNA gene variants in urban, pasture, and natural habitats.** *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1730–1734. doi: 10.1128/AEM.03300-12

275. P. Learoyd. (2006.). **A short history of blood transfusion.** *Leeds Blood Centre, stt-042, 18 pp* [Online]. Available: <http://hospital.blood.co.uk/library/pdf/trainingeducation/historyoftransfusion.pdf>
276. Palomar, A. M., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., Santibáñez, S., Portillo, A., et al. (2012). **Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain.** *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1188–1191
277. Park,J.,Choi,K.S.,and Dumler,J.S.(2003).**Major surface protein 2 of Anaplasma phagocytophilum facilitates adherence to granulocytes.** *Infect.Immun.* 71, 4018–4025.doi: 10.1128/IAI.71.7.4018-4025.20034
278. Parola, P., Davoust, B., Raoult, D., (2005). **Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses.** *Vet. Res.* 36, 469–492.
279. Passamonti, F., Veronesi, F., Cappelli , K., et al. (2010). **Anaplasma phagocytophilum in horses and ticks: A preliminary survey of Central Italy.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, Volume 33, Issue 1, January 2010, Pages 73–83*
280. Pennisi, M.G., (2014). **Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update.** *Veterinary Parasitology* 208 (2015) 35-47
281. Pennisi, M.G., Caprì, A., Solano-Gallego, L., et al. (2012). **Prevalence of antibodies against Rickettsia conorii, Babesia canis, Ehrlichia canis, and Anaplasma phagocytophilum antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy).** *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3(5–6):315–8.
282. Penocchio, G. (26/11/2013). **Quesito FNOVI: Emoderivati ed emocomponenti – richiesta di chiarimenti in merito all’applicazione del D.Lgs. 193/2006 .** *Prot. N. 5071/2013/F/er*
283. Penzhorn, B.L.,(2011). **Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An evolutionary perspective.** *Parasite Vectors* 4, 51
284. Perez,M., Rikihisa, Y., Wen,B., (1996) **Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization.** *J. Clin. Microbiol. September 1996 vol. 34 no. 9 2133-2139*
285. Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., et al. (2008). **In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies.** *Science* 321:970 –974.

286. Petney, T.N., Pfaeffle, M.P., Skuballa, J.D. (2012). **An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany.** *System Appl Acarol.* 2012;17:115–70.
287. Polak, K., Acierno, M., et (2015). **Dog erythrocyte antigen 1 : mode of inheritance and initial characterization.** *Vet Clin Pathol* 44/3 (2015) 369 – 379
288. Popov VL, Korenberg EI, Nefedova VV, et al. (2007). **Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected Ixodes persulcatus ticks in the course of coinfection with Rickettsia, Borrelia, and a flavivirus.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007;7:699–716
289. *Pract.* 2003 Jul;33(4):885-904, viii.
290. Prittie, J., (2004). **Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14(3) 2004, pp 167 – 176.
291. Prittie, J.E. (2010). **Controversies related to red blood cell in transfusion in critically ill patients.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 20 (2) : 167 -176, 2010
292. Reine, N.J., (2004). **Infection and blood transfusion: a guide to donor screening.** *Clin Tech Small Anim Pract.* 2004 May;19(2):68-74.
293. Reine, N.J., (2004). **Infection and blood transfusion : a guide to donor screening.** *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Vol 19, No.2 (May), 2004: pp 68 -74
294. Reis, A.B., Martins-Filho, et al., (2005). **Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis.** *Research in Veterinary Science* 81 (2006) 68-75
295. Rejmanek ,D.1., Freycon, P., Bradburd G. et al (2013). **Unique strains of Anaplasma phagocytophilum segregate among diverse questing and non-questing Ixodes tick species in the western United States.** *Ticks Tick Borne Dis.* 2013 Dec;4(6):482-7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.06.003. Epub 2013 Aug 30.
296. Rejmanek, D.1., Bradburd, G., Foley, J. (2012). **Molecular characterization reveals distinct genospecies of Anaplasma phagocytophilum from diverse**

- North American hosts.** *J Med Microbiol.* 2012 Feb;61(Pt 2):204-12. doi: 10.1099/jmm.0.034702-0. Epub 2011 Sep 15.
297. Renè- Martellet, M., Lebert,I., Chene, J., et al. (2015). **Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe.** *Parasit Vectors.* 2015; 8: 3. Published online 2015 Jan 6. doi: 10.1186/s13071-014-0613-4 PMCID: PMC4302712
298. Rikihisa, Y. (2011). **Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum.** *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 469–489. doi: 10.1128/CMR.00064-10
299. Rinaldi, L., Musella, V., Biggeri, A., Cingoli, G., (2006). **New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology.** *Geospatial Health* 1, 33–47.
300. Rinaldi, L., Spera, G., Musella, V., et al. (2007). **A survey of fleas on dogs in southern Italy.** *Vet Parasitol* 2007, 148:375-378.
301. Rivas, G.B., De Souza, N.A., Peixoto, A.A., Bruno, R.V.(2014). **Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae).** *Parasit Vectors* 2014 19; 7: 278
302. Rogers M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., et al. (2004). **Transmission of cutaneous leishmaniasis by sandflies is enhanced by regurgitation of fPPG.** *Nature*, 430, 463–467.
303. Rogers, D.J., Randolph,S.E.(2006) .**Climate change and vector-borne diseases.** *Adv Parasitol* 2006, 62:345-381.
304. Rohousova, I. & Volf, P. (2006) . **Sandfly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission.** *Folia Parasitologica*, 53,161–171.
305. Romi. R., Majori, G. (2008). **An overview of the lesson learned in almost 20 years of fight against the “tiger mosquito”.** *Parassitologia* 2008, 50:117-119.
306. Rossi,E., Bongiorno, G., Ciolli, E., et al.(2008). **Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural Leishmania infection of Phlebotomus perniciosus (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy.** *Acta Trop.* 2008 Feb;105(2):158-65. Epub 2007 Oct 18

307. Rozanski, E., De Laforcade, A.M.(2004).**Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine.** *Clin.Tech. Small Anim. Pract.* 19(2); 83 - 7
308. Rubel,F., Brugger, K., Monazahian, M., et al. (2014). **The first German map of georeferenced ixodid tick locations.** *Parasit Vectors.*2014;7:477.
309. Rubini, A.S., Paduan, K.S, Von Ah Lopes, V., et al. (2008). **Molecular and parasitological survey of hepatozoon canis (Apicomplexa : Hepatozoidae)in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil.** *Parasitol. Res.* 102, 859-899
310. Sainz, A., Roura, X., Mirò, G., et al (2015). **Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe.** *Parasites & Vectors*20158:75
311. Sakuma, M., Nakahara, Y., Suzuki, H., et al. (2009). **A case report: a dog with acute onset of Hepatozoon canis infection.** *J. Vet. Med. Sci.* 71.835-838.
312. Santoro Beer, K., Silverstein,C. (2015). **Controversies in the use of fresh frozen plasma in critically ill patients with a coagulopathy before invasive procedures : a randomized clinical trial (CME).** *Trasnfusion 1* : 26 -35, 2015
313. Sarkar A1, Hellberg L, Bhattacharyya A,et al. (2012). **Infection with Anaplasma phagocytophilum activates the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and NF-κB survival pathways in neutrophil granulocytes.** *Infect Immun.* 2012 Apr;80(4):1615-23. doi: 10.1128/IAI.05219-11. Epub 2012 Jan 17.
314. Sasanelli, M., Paradies, P.,Greco, B., et al. (2010) **Failure of imidocarb dipropionate to eliminate Hepatozoon canis in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods.** *Vet. Parasitol.* 171, 194-199
315. Schnittger,L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen,M. et al.(2012). **Babesia: A world emerging.** *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012) 1788–1809
316. Schoeman, J.P. (2009) **Canine babesiosis.** *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 76:59–66 (2009)
317. Schorn, S., Pfister, K., Reulen, H., Mahling, M., Manitz, J., Thiel, C., et al. (2011). **Prevalence of Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus in Bavarian public parks, Germany.** *Ticks Tick Borne Dis.* 2, 196–203. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.09.009

318. Scorpio,D.G.,Akkoyunlu,M.,Fikrig,E.,and Dumler,J.S.(2004).**CXCR2 blockade influences Anaplasma phagocytophilum propagation but not his-topathology in themouse model of human granulocytic anaplasmosis.** *Clin.Diag.Lab. Immun.* 11, 963–968.
319. Senzolo, M., Gentilini, F., Zoia, A., Caldin, M .(2014). **Evaluation of changes in coagulation times (PT and APTT) after intravenously vitamin K administration in 73 dogs intoxicated with anticoagulant rodenticide.** *J Vet Intern Med* 2014, 28:725.
320. Seth, M., Jackson, KV., et al (2012). **Comparison of gel column, card, and cartridge techniques for dog erythrocyte antigen 1.1 blood typing.** *Am J Vet Res.* 2012 Feb; 73 (2) : 213 219
321. Shpynov SN., Fournier PE., Rudakov NV., et al.(2006). *Molecular identifi-cation of a collection of spotted Fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia.* *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(3):440–3.
322. Sibley, L.D. (2011). **Invasion and intracellular survival by protozoan par-asites.** *Immunol. Rev.* 240:72–91.
323. Sikorski, L.E., Birkenheuer, A.J., Holowaychuk, M.K., et al.(2010). **Babesi-osis caused by a large Babesia species in 7 immunocompromised dogs.** *J Vet Intern Med* 2010;24(1):127–31.
324. Silaghi,C.,Skuballa,J.,Thiel,C ,et al.(2012a). **The European hedgehog (Eri-naceus europaeus)– a suitable reservoir for variants of Anaplasma phago-cytophilum?** *TicksTick-BorneDis.* 3,49–54.doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.11.005
325. Silaghi,C.,Woll,D.,Hamel,D., et al. (2012b). **Babesia spp. and Anaplasma phagocytophilum in questing ticks,Ticks parasitizing rodents and the par-asitized rodents-analyzing the host- pathogen-vector interface in a metro-politan area.** *Parasit.Vectors* 5:191.doi:10.1186/1756-3305-5-191
326. Silveira, J.A., Passos, L.M., Ribeiro, M.F.(2009).**Population dynamics of Rhipicephalus sanguineus (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Ge-raís state, Brazil.** *Vet Parasitol* 2009, 161:270-275.
327. Silveira, J.A.G.,Valente, P.C.L.G.,Paes, P.R.O.,et al. (2015). **The first clini-cal and laboratory evidence of co-infection by Anaplasma phagocytophi-lum and Ehrlichia canis in a Brazilian dog.** *Ticks Tick-BorneDis.*6,242–245.doi:10.1016/j.ttbdis.2015.01.003

328. Simoes, P.B., Cardoso, L., Araujo, M., et al. (2011). **Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission.** *Parasit Vectors*. 2011;4:50.
329. Skarphedinsson, S., Jensen, P.M., Kristiansen, K., (2005). **Survey of tick-borne infections in Denmark.** *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1055–1061.
330. Skotarczak, B., Rymaszewska, A., Wodecka, B., Sawczuk, M., Adamska, M., and Maciejewska, A. (2006). **PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland.** *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, 21–23
331. Slater, M.R., Di Nardo, A., Pediconi, O., et al. (2008). **Free-roaming dogs and cats in central Italy.** *Prev. Med. Vet* 2008. Apr. 17;84(1-2); 27-47
332. Smith, T.G. (1996). **The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina).** *J Parasitol.* 82, 565-585.
333. Snow, S.J., Jutkowitz, L.A., et al. (2010). **Trends in plasma transfusion at a veterinary teaching hospital: 308 patients (1996- 1998 and 2006- 2008).** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(4) 2010, pp 441 – 445
334. Socolovschi, C., Bitam, I., Raoult, D., et al. (2009) **Transmission of *Rickettsia conorii conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*.** *Clin Microbiol Infect* 15(Suppl 2):319-321
335. Solano -Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., et al. (2007) **Detection of *L. infantum* by fret-based-real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis.** *Vet Parasitol* 2007 Jul 20; 147 (3-4) 315-9
336. Solano -Gallego, L., Sainz, A., Roura, X., et al. (2016). **A review of canine babesiosis: the European perspective.** *Parasites & Vectors* 2016;9:336
337. Solano-Gallego, L., Baneth, G.. (2011). **Babesiosis in dogs and cats – expanding parasitological and clinical spectra.** *Vet Parasitol.* 2011;181:48–60.
338. Solano-Gallego, L., et al., 2011. **Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis.** *Parasites & Vectors*, 2011, 4:86
339. Solano-Gallego, L., Trotta, M., Caldin, M., Furlanello, T. (2008). **Molecular survey of *Rickettsia* spp. in sick dogs in Italy.** *Zoonoses Public Health* 2008, 55:521- 525
340. Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., et al. (2009) . **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis.** *Vet Parasitol.* 2009 Oct 28;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vet-par.2009.05.022. Epub 2009 Jun 6. 15;227(6):942-7.

341. Solomon, SB., Wang, D., Sun, J., et al. (2013). **Mortality increases after massive exchange transfusion with older stored blood in canines with experimental pneumonia.** *Blood*, 2013 Feb 28; 121(9): 1663–1672.
342. Sonenshine, D.E., and Roe, R.M. (eds.). (2014). **Biology of Ticks .Volume 2, Second**
343. Spada E., Gavazza A., Ferro E., Lubas G., et al. (2015). **Prevalence of Dog Erythrocyte Antigen 4 and 7 in Italian canine blood donors using gel agglutination technique.** *25th ECVIM-CA Congress, Lisbon (Portugal), 10-12 September 2015.*
344. Spitalská E., Boldis V., Kostanova Z., et al. (2008). **Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia.** *Acta Virol.* 2008;52(3):175–9.
345. Stanek, G. (2009). **Büchseder Pandora: Krankheitserregerin Ixodes ricinus-Zecken In Mitteleuropa.** *Wien. Klin. Wochenschr.* 121, 673–683. doi:10.1007/s00508-009-1281-9
346. star.evodexeu.eu
347. Stegeman, J.R., Birkenheuer, A.J., Kruger, J.M., et al. (2003). **Transfusion associated Babesia gibsoni infection in a dog.** *J Am Vet Med Assoc.* 2003;222:959–63.
348. Stokol, T., Parry, B.W. (1998). **Efficacy of fresh frozen plasma and cryoprecipitate in dog with von Willebrand's disease and hemophilia A.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12 : 84 -92, 1998
349. Stuenkel et al. (2013) **Anaplasma phagocytophilum ecology sialylated glycoproteins to promote infection of mammalian host cells.** *Infect. Immun.* 80, 3748–3760. doi: 10.1128/IAI.00654-12
350. Stuenkel, S. (2003). **Anaplasma phagocytophilum (formerly Ehrlichia phagocytophila) Infection in Sheep and Wild Ruminants in Norway. A study on clinical manifestation, distribution and persistence.** *Dr Philos thesis, Norwegian School of Veterinary science, Oslo*
351. Tabar, M.D., Francino, O., Altet, L., et al. (2009). **PCR survey of vector-borne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for Leishmaniasis.** *Vet. Rec.* 164, 112-116.

352. Tabar, M.D., Roura, X., Francino, O., et al.(2008). **Detection of Leishmania infantum by real-time PCR in a canine blood bank.** *Journal of Small Animal Practice* 49 (2008) 325-328
353. Tai NO., Osman OF., el Fari M., et al.,(2000) **Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing.***Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 Sep-Oct;94(5):575-9.
354. Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2010). **Parassitologia e Malattie Parassitarie degli Animali.** *Ln. EMSI, p.p 409-411, 687-688, 699 -700*
355. Testini, G., Otranto, D., Dantas-Torres F., et al. (2010). **Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study.** *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3316–24.
356. Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero-Martínez, M.T.,et al. (2009). **Prevalence of Rhipicephalus sanguineus ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border.** *Vet Rec* 2009, 164:59-61.
357. Tocci, L.,J. (2010). **Transfusion medicine in small animal practice.** *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 40(3), 485–94.
358. Tocci, L.J., Ewing, P.J., (2009). **Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine : an overview of pretransfusion testing.** *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 19 (1), 1476 - 4431
359. Torina A., Blanda., Antoci F., (2013). **A Molecular survey of Anaplasma spp., Rickettsia spp., Ehrlichia canis and Babesia microti in foxes and fleas from Sicily.** *Transbound Emerg Dis.* 2013 Nov;60 Suppl 2:125-30. doi: 10.1111/tbed.12137.
360. Torina A1, Galindo RC, Vicente J (2010). **Characterization of Anaplasma phagocytophilum and A. ovis infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition.** *Trop Anim Health Prod.* 2010 Oct;42(7):1327-31. doi: 10.1007/s11250-010-9580-8. Epub 2010 Apr 20.
361. Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., et al, (2008) **Characterization of Anaplasma phagocytophilum in Sicily.** *Animal Biodiversity and Emerging Diseases Prediction and Prevention, Volume 1149*Pages 90–93,

362. Tozon, N., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., (2003). **Clinical and laboratory features of the first detected cases of *A. phagocytophila* infections in dogs from Slovenia.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 990, 424–428.
363. Trotta, M., Nicetto, M., Fogliazza, A., et al. (2012). **Detecton of *L. infantum*, *B. canis* and *rickettsiae* in ticks removed from dogs living in Italy.** *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Dec; 3(5-6) 294-7
364. Tsachev, L., Ivanov, A., Dinev, I., et al. (2008). **Clinical Ehrlichia canis and Hepatozoon canis co-infection in a dog in Bulgaria.** *Rev. Med.Vet-159*, 68-73.
365. Tvedten, H.(2012). **Laboratory and clinical diagnosis of anemia .** *Ln : Schalm's veterinary hematology, 6th edition. Wiley Blackwell, Iowa (USA), pp. 152 – 161, 2012.*
366. Uilenberg, G. 2006. **Babesia—a historical overview.** *Vet. Parasitol.* 138: 3–10.
367. Urban, R., Couto, CG, Iazbik, MC., (2013) . **Evaluation of hemostatic activity of canine frozen plasma for transfusion by thromboelastography.** *J Vet Intern Med* 27, 964–969
368. Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 2007 Ristampa. **Veterinary Parasitology – Second Edition, 3 (2007) 254-261**
369. Vascellari, M., Ravagnan, S., Carminato, A., et al. (2016). **Exposure to vector-borne pathogens in candidate blood donor and free-roaming dogs of northeast Italy.** *Parasites & Vectors* (2016) 9:369
370. Villarnovo, D., Burton, S.A., Horney, B.S.. et al. (2016). **Preliminary evaluation of a gel tube agglutination major cross – match method in dogs.** *Veterinary Clinical Pathology, Vo 45, Issue 3, September 2016, Pages 411- 416.*
371. Vlaar, A.P., Juffermans, N.P. (2013). **Transfusion-related acute lung injury: a clinical review.** *Lancet* 2013, 382:984–94.
372. Vlkova, M., Rohousova, I., Drahota, J. et al. (2011) **Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission.** *PloS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1344.
373. Volf, P., Volfova, V. (2011). **Establishment and maintenance of sand fly colonies.** *J Vector Ecol* 2011; 36: S1–9

374. Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G. (2000). **Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world.** *Cambridge: Cambridge University Press 2000.*
375. Walton, J.E., Hale, A.S., Brooks, M.B., et al. (2014). **Coagulation Factor and Hemostatic Protein Content of Canine Plasma after Storage of Whole Blood at Ambient Temperature.** *J Vet Intern Med* 2014, 28:571–5.
376. Wang, X.Q., Kikuchi, T., and Rikihisa, Y. (2006). **Two monoclonal anti-bodies with defined epitopes of P44 major surface proteins neutralize Anaplasma phagocytophilum by distinct mechanisms.** *Infect. Immun.* 74, 1873–1882. doi: 10.1128/IAI.74.3.1873-1882.2006
377. Wardrop, K. J. (2007). **New red blood cell antigens in dogs and cats-- a welcome discovery.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(2), 205–6.
378. Wardrop, K.J., Birkenheuer, A., Blais, M.C., et al. (2016). **Update on canine and feline blood donor screening for blood-borne pathogens.** *Journal Of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30 : 15-35.
379. Wardrop, K.J. (2007). **Transfusion Medicine.** In. *Saunders (Ed.,) Handbook of small animal practice (pp. 707-713).*
380. Wardrop, K.J., Birkenheuer, A., Blais, M.C., et al. (2016). **Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens.** *J Vet Intern Med.* 2016 Jan-Feb;30(1):15-35. doi: 10.1111/jvim.13823.
381. Wardrop, K.J., Reine, N.J., Birkenheuer, A., et al (2005) **Canine and feline blood donor screening for infectious disease.** *J Vet Intern Med.* 2005 Jan-Feb;19(1):135-42.
382. Watanabe, M., Okuda, M., Tsuji, M., et al. (2004) . **Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan.** *Veterinary Parasitology, Volume 124, Issues 1–2, 20 September 2004, Pages 101–107*
383. Weinstein, N.M. (2015). **Transfusion Reactions.** Ln : *Schalm's veterinary hematology, 6th edition.* Wiley Blackwell, Iowa (USA), 2012, pp. 769 -775
384. Welzl, C., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., et al. (2001). **Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ damage/dysfunction in complicated babesiosis.** *J S Afr Vet Assoc* 2001;72:158–62.

385. Wen,B., Rikihisa, Y., Mott,JM:, et al. (1997) **Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in dogs treated with doxycycline.** *J. Clin. Microbiol.* July 1997 vol. 35 no. 7 1852-1855
386. Wielinga, P. R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, A., de Vries, A., Dimmers, W., et al. (2006). **Longitudinal analysis of tick densities and Borrelia, Anaplasma, and Ehrlichia infections of Ixodes ricinus ticks in different habitat areas in The Netherlands.** *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7594–7601. doi: 10.1128/AEM.01851-06
387. Yago,T.,Leppanen,A.,Carlyon,J.A., et al.(2003). **Structurally distinct requirements for binding of P-selectin glycoprotein ligand-1 and sialyl Lewis X to Anaplasma phagocytophilum and P-selectin.** *J. Biol.Chem.* 278, 37987–37997.
388. Yaxley,P.E., Beal, M.W., Jutkowitz, L.A., et al. (2010). **Comparative stability of canine and feline hemostatic proteins in freeze-thaw-cycled fresh frozen plasma.** *J Vet Emerg Crit Care* 2010, 20:472–8.
389. Yeagley, T.J., Reichard, M.V., Hempstead, J.E., et al. (2009). **Detection of Babesia gibsoni and the canine small Babesia 'Spanish isolate' in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations.** *J Am Vet Med Assoc.* 2009;235:535–9.
390. Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., Gothe, R. (2000). **Detection of a new pathogenic Babesia microti-like species in dogs.** *Vet Parasitol.* 2000;89:241–8.
391. Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R. (1998). **Characteristic genotypes discriminate between Babesia canis isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs.** *Parasitol Res.* 1998;84:544–8.

SITOGRAFIA

1. www.fleatickrisk.com
2. www.labs.russel.wisc.edu.com
3. www.theguardian.com
4. www.todaysveterinarypractice.navc.com
5. www.agrolabo.it
6. www.alvedia.com
7. www.anmvi.it
8. www.avismonza.it
9. www.controcampus.it
10. www.dartmoorcam.uk
11. www.dogblooddonors.it
12. www.fnovi.it
13. www.haemonetics.com
14. www.influenzialpoin.com
15. www.medicalexpo.it
16. www.petsblog.it
17. www.rapidvet.com
18. www.reseauborreliose.fr
19. www.sanmarcove.it
20. www.studyblue.com
21. www.veteriankey.com

RINGRAZIAMENTI

Vorrei rivolgere i miei più sentiti ringraziamenti al Prof, Lubas, alla Dott.ssa Gavazza, alla Dott.ssa Ebani, alla Prof.ssa Mancianti e al Dottor Guido Rocchigiani per il loro aiuto prezioso, la cortesia e la disponibilità che mi hanno sempre riservato e, soprattutto, per tutti gli insegnamenti che mi hanno trasmesso durante la stesura del lavoro.

Un ringraziamento è dovuto anche ai cani donatori e ai loro proprietari, non solo per la realizzazione della tesi ma ,in generale, per la loro attività di vitale importanza, con l'auspicio che questo spirito altruistico possa diffondersi sempre più a macchia d'olio.

Naturalmente ringrazio i miei genitori, Paola e Mario, per il sostegno che mi hanno sempre dato, economico e spirituale, da quando mi hanno stretto tra le braccia per la prima volta, antepoendo me alla loro vita e alle loro esigenze.. senza di loro non sarei qui adesso.

Un ringraziamento affettuoso va ai miei amici/colleghi conosciuti all'Università, con i quali ho trascorso momenti indimenticabili di grande serenità e divertimento (nonché di grande ansia !): Sara, Sharon (le mie adorate ex- coinquiline) Lorenzo, Viola, Giacomo, Fabrizio, Veronica e tutti gli altri.

Un ulteriore ringraziamento va alle mie amiche di La Spezia, che negli anni mi hanno accompagnato nel mio percorso di vita : Silvia, Erika , Elena e tutte le altre .

Infine, il ringraziamento più importante va al mio adorato Nereo, colui che mi ha dato la motivazione per iniziare e portare avanti questo percorso sino alla conclusione, e al piccolo Glauco, piccolo grande terremoto che mi ha riempito la vita e mi sta di nuovo insegnando ad amare.